



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

AMILOIDOSI SISTEMICA NEL GATTO:
ANALISI PROTEOMICA E BIOMARKER
DISCOVERY SUL SIERO

Relatore
Prof. Eric Zini

Laureanda
Marcato Anna
Matricola n.
1165653

ANNO ACCADEMICO 2021 - 2022

RIASSUNTO

In questo studio, attraverso l'utilizzo della spettrometria di massa, si è provato a valutare se ci fossero differenze tra il profilo proteico di gatti con amiloidosi rispetto a gatti sani.

Sono stati esaminati in totale 10 gatti provenienti da 3 rifugi diversi del nord Italia di cui 6 con amiloidosi e 4 senza. I gatti positivi ad amiloidosi presentavano fibrille di amiloide in almeno un organo tra fegato, milza e rene. La malattia veniva confermata con la positività dei tessuti all'esame istologico eseguito post-mortem.

I soggetti venivano inclusi nello studio solamente se la morte era avvenuta spontaneamente o se erano stati soppressi a causa delle loro gravi condizioni cliniche.

L'analisi proteomica ha identificato 9 proteine differenzialmente espresse in gatti con amiloidosi rispetto ai gatti sani. Si è visto che 5 di queste proteine venivano meno espresse in gatti malati mentre le restanti 4 risultavano più espresse nei gatti malati rispetto a quelli sani.

In conclusione, si è provato ad ipotizzare il motivo di una diversa espressione proteica tra gatti malati e gatti sani. In base alla letteratura, non sembra esserci una ovvia relazione tra le proteine che risultano meno espresse in gatti malati e lo sviluppo di amiloidosi. È stato invece identificato un possibile legame tra maggior espressione di alcune proteine e lo sviluppo di malattia.

Il ruolo di queste proteine in gatti affetti da amiloidosi necessita d'essere ulteriormente approfondito.

ABSTRACT

In this study, through the use of mass spectrometry, we tried to assess whether there were differences between the protein profile of cats with amyloidosis compared with healthy cats.

A total of 10 cats from 3 different shelters in northern Italy were examined of which 6 had amyloidosis and 4 without. Positive cats with amyloidosis had amyloid fibrils in at least one organ including liver, spleen, and kidney. Disease was confirmed by tissue positivity on histological examination performed postmortem.

Subjects were included in the study only if death had occurred spontaneously or if they had been suppressed because of their severe clinical condition.

Proteomic analysis identified 9 proteins differentially expressed in cats with amyloidosis compared with healthy cats. It was seen that 5 of these proteins were less expressed in diseased cats while the remaining 4 were more highly expressed in diseased cats than in healthy cats.

In conclusion, we tried to hypothesize the reason for different protein expression between diseased and healthy cats. Based on the literature, there does not seem to be an obvious relationship between proteins that are less expressed in diseased cats and the development of amyloidosis. Instead, a possible link between increased expression of certain proteins and disease development has been identified.

The role of these proteins in cats with amyloidosis needs further investigation.

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 LA MALATTIA	7
1.1.1 CLASSIFICAZIONE BIOCHIMICA	7
1.1.2 AMILOIDOSI SISTEMICHE	10
1.1.3 PATOGENESI AMILOIDOSI	11
1.1.4 DIAGNOSI ISTOLOGICA	14
1.2 PROTEOMICA E SPETTROMETRIA DI MASSA	16
1.3 SCOPO DELLO STUDIO	17
2. MATERIALI E METODI	19
2.1 CASI E CRITERI DI INCLUSIONE DEI DATI	19
2.2 ESAMI DI LABORATORIO PER L'ANALISI PROTEOMICA	19
2.2.1 LISI CELLULARE	19
2.2.2 RIDUZIONE, ALCHILAZIONE, DIGESTIONE	20
2.2.3 PRECIPITAZIONE SDS	21
2.2.4 SOLID PHASE EXTRACTION (SPE) CON DISCOVERY DSC-18 SOLID PHASE EXTRACTION (SIGMA)	21
2.3 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO, BIOCHIMICO, URINARIO	22
3. RISULTATI	25
3.1 RISULTATI DEGLI ESAMI EMATOBIOCHIMICI	25
3.1.1 ANALISI DELLE ALTERAZIONI RISCONTRATE	26
3.2 RISULTATI ESAMI ECOGRAFICI E ISTOLOGICI	31
3.3 RISULTATI DELL'ANALISI PROTEOMICA	35
3.3.1 PROTEINE MENO ESPRESSE NEI GATTI AA+	36
3.3.2 PROTEINE PIU' ESPRESSE NEI GATTI AA+	38
4. DISCUSSIONE	39
4.1 ANALISI DELLE PROTEINE RILEVATE	39
4.1.1 ALPHA-2-ANTIPLASMIN	39
4.1.2 INHIBITOR OF CARBONIC ANHYDRASE-LIKE	41
4.1.3 ALPHA-ENOLASE	42
4.1.4 FIBULIN-1	43
4.1.5 COMPLEMENT C3-LIKE	44
4.1.6 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-BINDING PROTEIN COMPLEX ACID LABILE SUBUNIT	46
4.1.7 ANGIOTENSINOGEN	47
4.1.8 IG λ VARIABLE	48
4.1.9 APOLIPOPROTEIN C-1	49
4.2 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELL'ANALISI PROTEOMICA	50
4.3 LIMITI DELLO STUDIO	59
5. CONCLUSIONE	61
6. BIBLIOGRAFIA	63

1. INTRODUZIONE

1.1 LA MALATTIA

Il termine "amiloidosi" è stato coniato nel 1838 da Matthias Schleiden, un botanico tedesco, per descrivere un normale costituente amilaceo delle piante. Il patologo tedesco Rudolph Virchow nel 1854 usò questo termine per descrivere la peculiare reazione dei corpi amilacei del sistema nervoso allo iodio (Kyle, 2001).

Al giorno d'oggi, per definizione, con il termine "amiloidosi" si intendono un gruppo di malattie sistemiche o localizzate, eterogenee l'una dall'altra, che prevedono tutte l'accumulo di materiale proteico chiamato amiloide a livello extracellulare di vari tessuti e organi del corpo. Le proteine solubili si aggregano e si depositano nei tessuti sotto forma di fibrille insolubili, causando una progressiva disfunzione degli organi (Picken, 2020).

1.1.1 CLASSIFICAZIONE BIOCHIMICA

La classificazione delle amiloidosi si basa sulla proteina precursore che forma le fibrille amiloidi e sulla distribuzione del deposito di amiloide, che può essere sistemico o localizzato. Nell'uomo sono state identificate più di 30 proteine amiloidi, di cui 10 sono state documentate anche negli animali (Ferri et al. n.d.). Le principali forme di amiloidosi sistemica possono coinvolgere la catena leggera delle Ig (AL), la catena pesante delle Ig (AH) o possono essere l'amiloide A (AA), le amiloidosi familiari o ereditarie, l'amiloidosi sistemica senile e l'amiloidosi da β 2-microglobulina (β 2m) (Picken, 2020).

Nell'amiloidosi AL, una catena leggera di immunoglobuline (Ig) o un frammento di catena leggera prodotto da plasmacellule clonali, si deposita nei tessuti come amiloide. Qualsiasi organo, ad eccezione del sistema nervoso centrale, può essere sede di deposizione di amiloide AL e il rene è colpito nella maggior parte dei soggetti (Picken, 2020).

L'amiloidosi AA, invece, è una rara complicanza sistemica che si verifica in presenza di un disturbo infiammatorio di lunga durata. Uno studio ha presentato la sequenza completa della proteina trovata nei depositi di amiloide: si è visto che le proteine derivate dalle fibrille isolate da diversi laboratori differivano leggermente in lunghezza, da 68 a 76 aa, ma condividevano residui N-terminali comuni. La proteina amiloidogena accumulata è rappresentata dalla

proteina sierica A (SAA), un'apolipoproteina reagente di fase acuta sintetizzata in gran parte dagli epatociti sotto la regolazione trascrizionale di citochine proinfiammatorie (Sack 2018).

L'indice di durata della malattia osservato nei gatti affetti da amiloidosi AA ha dimostrato che, più a lungo un animale è stato malato per qualsiasi motivo, più alta è la possibilità di deposizione di amiloide. Nei gatti domestici a pelo corto, l'amiloidosi AA è stata segnalata solo aneddoticamente ed è considerata una malattia rara, mentre uno studio (Ferri et al. n.d.) ha riportato che in gatti presenti in 3 rifugi analizzati, più del 50% dei soggetti presentava depositi di amiloide nel fegato, nella milza e nei reni. È stato osservato che l'AA-amiloidosi rientra tra i problemi di salute più rilevanti per i gatti ospitati nei rifugi. Questa osservazione è in netto contrasto con le osservazioni sui gatti di proprietà dei clienti, per spiegare questo si è ipotizzato che la trasmissione della malattia possa avvenire attraverso materiale contaminato ingerito dall'animale e che le feci contenenti frammenti di SAA possano svolgere un ruolo nella trasmissione. Il sovraffollamento presente nei rifugi favorirebbe quindi la presenza della malattia (Ferri et al., n.d.).

La prevalenza eccezionalmente elevata di amiloidosi AA nei gatti da ricovero può essere causata da diversi fattori come: malattie infiammatorie croniche, infezioni, fattori ambientali sconosciuti o da loro combinazioni. In letteratura, la deposizione di SAA è risultata essere una conseguenza del rilascio di citochine proinfiammatorie in corso di patologie infiammatorie o neoplastiche. La maggior parte dei gatti dei rifugi era affetta da condizioni infiammatorie croniche concomitanti, come l'enteropatia cronica e la gengivostomatite, che potrebbero avere innescato la deposizione di amiloide (Ferri et al., n.d.).

Per meglio caratterizzare la sostanza amiloide è stata stilata una classificazione biochimica che si basa sul tipo di amiloide e sulla modalità in cui questa si deposita. L'amiloide viene caratterizzata da due lettere: la prima lettera A indica il termine "amiloide" mentre la seconda lettera indica la proteina principalmente coinvolta nella costituzione delle fibrille (Figura 1.1) (Picken, 2020).

Fibril protein	Precursor protein	Systemic (S), localized (L)	Acquired (A), hereditary (H)	Target organs
AL, AH	Immunoglobulin Light (L) or heavy (H) chain	S, L	A (H)*	All organs, usually except CNS**
AA	(Apo) serum amyloid A	S	A	All organs, except PNS*, CNS
ALECT2	Leukocyte chemotactic factor-2	S	A	Kidney primarily liver
ATTRv	Transthyretin variants (v)	S	H	Heart, PNS, ANS**, eye leptomeninges
AFib	Fibrinogen A α chain variants	S	H	Kidney primarily
Apolipoproteins AI, AII, CII, CIII	Apolipoprotein variants	S	H	all variants kidney, AApoAI also heart, liver, PNS, testis, larynx, skin
ALys, AGel	Lysozyme variants Gelsolin variants	S S	H H	Kidney PNS, cornea, kidney, heart
A β 2Mv	β_2 microglobulin variant	S	H	ANS
ATTRwt	Wild type, aging	S	A	Cardiac primarily, lung, ligaments, tenosynovium
AApoAIV	Apolipoprotein AIV Wild type, aging	S	A	Kidney medulla, systemic
ASem1	Semenogelin 1 Wild type, aging	L	A	Seminal vesicles
A β 2M	Wild type, iatrogenic (dialysis)	S	A	Musculo-skeletal system
AIns (insulin)	Iatrogenic	L	A	Injection sites
AEnf (enfurvitide)	Iatrogenic	L	A	
Endocrine	Various hormones: ANF*, calcitonin, IAPP**, prolactin	L	A	Cardiac atria, thyroid, islets of Langerhans, pituitary
Other	Various	L	A	Skin, aorta, cornea
Cerebral: A β , ABri, ACys, APrP	Wild type or variant Variants	L	A H	CNS

Figura 1.1: Classificazione amiloidosi

Le principali tipologie sono:

1. Amiloidosi AL: in cui sono coinvolte le catene leggere degli anticorpi.
2. Amiloidosi AA: in cui è coinvolta una proteina che viene prodotta dal fegato nella fase acuta di infiammazione.
3. Amiloidosi ATTR: dove è presente la transtiretina.
4. Amiloidosi A β 2m: in cui viene accumulata la microglobulina β 2m.
5. Amiloidosi ACal: caratterizzata dalla presenza di calcitonina, interessa le paratiroidi.
6. Amiloidosi AIAPP: in cui è presente un polipeptide che coinvolge le isole di Langerhans. Può essere causa del diabete nel gatto.
7. Amiloidosi AANF: localizzata a livello cardiaco.
8. Amiloidosi A β : è una forma cerebrale, la proteina coinvolta è associata a patologie neurodegenerative.
9. Amiloidosi AApoAI: è una forma localizzata nei vasi polmonari del cane ed è caratterizzata dalla deposizione di un'apolipoproteina carrier dei lipidi.

1.1.2 AMILOIDOSI SISTEMICHE

Le tipologie di amiloidosi AL e AA sono le principali forme sistemiche presenti negli animali (Woldemeskel 2012).

L'amiloidosi AL è una forma di amiloidosi che si manifesta spesso in associazione a neoplasie che colpiscono gli immunociti, in particolare si considerano due tipologie di neoplasie: plasmocitoma extramidollare, che colpisce le plasmacellule o i loro precursori e il mieloma multiplo, che colpisce il midollo osseo.

In queste forme accade che cellule B maligne sintetizzano quantità anomale di una singola specifica immunoglobulina (si parla di gammopatia monoclonale) con la formazione di cloni di cellule. Casi di questo tipo di amiloidosi sono stati riscontrati nel cane associati a linfoma delle cellule B. Oltre alla sintesi dell'intera immunoglobulina, possono essere trovate nel siero solo le catene leggere di tipo λ o κ , chiamate Bence Jones proteins. Nella gammopatia viene prodotta in particolare l'una o l'altra catena leggera. Le catene leggere sono piccole e attraversano la barriera glomerulare causando quindi proteinuria che viene nominata "Bence Jones proteinuria". La presenza di elevate quantità di proteina di Bence Jones non spiega però da sola la formazione della sostanza amiloide.

I depositi localizzati di AL possono essere visti come noduli in vari organi e sono spesso associati ad infiammazione mononucleare (linfociti, plasmacellule) (Gertz, 2020).

La forma di amiloidosi AA (reactive systemic amyloidosis) è la forma più frequente ed è associata a condizioni infiammatorie croniche persistenti nel tempo, infettive e non infettive. Non è associata a neoplasie della linea linfoide ma è spesso associata a tumori non linfoidi che rappresentano situazioni patologiche croniche (Woldemeskel 2012).

La proteina A sierica è la principale proteina di fase acuta felina prodotta principalmente, ma non esclusivamente, nel fegato (Ferri et al. n.d.).

La SAA normalmente si trova nel sangue legata alle lipoproteine ad alta densità. Questa proteina aumenta in diverse condizioni infiammatorie e questo fa sì che la SAA venga tradizionalmente utilizzata per diagnosticare l'infiammazione nei gatti. In ogni caso, aumenti lievi o moderati, possono essere riscontrati anche in malattie sistemiche come l'insufficienza renale, i tumori e il diabete mellito. In queste condizioni c'è una grande stimolazione della proteina di fase acuta del fegato che in condizioni di infiammazione cronica viene prodotta continuamente. L'incremento di SAA derivante da infiammazione è condizione necessaria ma

non sufficiente per produrre la deposizione di amiloide AA (come nell'amiloide AL) (Woldemeskel 2012).

Nelle amiloidosi familiari umane sono presenti mutazioni genetiche ereditarie che rendono una proteina amiloidogena. Nonostante la presenza della proteina anomala fin dalla nascita, le manifestazioni della malattia non diventano evidenti fino all'età adulta, suggerendo un ruolo dell'invecchiamento nel potenziale amiloidogenico di queste proteine (Benson 2003). Negli animali da compagnia, invece, la deposizione di AA-amiloide si verifica in forma familiare in razze specifiche, tra cui gatti abissini, siamesi e cani Shar-Pei (Ferri et al. n.d.).

1.1.3 PATOGENESI AMILOIDOSI

L'amiloidosi è il risultato di un ripiegamento anomalo delle proteine che ne causa il deposito, sotto forma di fibrille, nel tessuto extracellulare alterandone quindi la normale funzione. Questo ripiegamento avviene attraverso la formazione di intermedi con conformazioni di folding diverse e progressivamente vicine alla conformazione beta. Gli intermedi non correttamente ripiegati sono instabili e quando il livello di conformazione β raggiunge una certa quantità nella proteina, cominciano a formarsi degli aggregati proteici che diventano protofibrille e poi fibrille (Figura 1.2). La conformazione β costituisce solo l'asse principale della fibrilla, non la sua totalità (Picken, 2020).

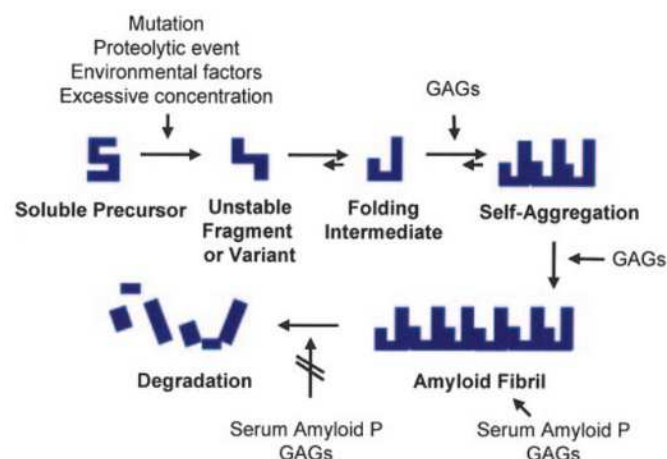


Figura 1.2: Formazione delle fibrille amiloidi. Una proteina instabile subisce delle alterazioni nel ripiegamento generando degli intermedi di ripiegamento anomalo. L'autoaggregazione di questi intermedi produce dei protofilamenti. Le fibrille amiloidi sono costituite da quattro o sei protofilamenti raggruppati l'uno sull'altro. La fibrillogenesi è promossa dai glicosaminoglicani (GAG) e i depositi di amiloide sono stabilizzati e protetti dalla proteolisi dai GAG e dall'amiloide P del siero.

L'esatta patogenesi dell'AA-amiloidosi non è stata completamente chiarita. Tuttavia, sono state proposte diverse ipotesi come l'aumento delle concentrazioni circolanti di SAA, difetti nelle proprietà degradative dei monociti o anomalie strutturali genetiche delle proteine. Altri fattori, come i fattori di potenziamento dell'amiloidosi e i glicosaminoglicani, possono partecipare all'amiloidogenesi accelerando la deposizione delle fibrille amiloidi (Ferri et al. n.d.).

Le proteine che formano la sostanza amiloide possono essere proteine normali che hanno una tendenza intrinseca a conformarsi in modo anomalo, per cui tendono a formare fibrille quando vengono prodotte in elevata quantità oppure possono essere proteine mutate, prodotte da un gene mutato. Nel secondo caso la mutazione è la causa dell'anomala conformazione: sono proteine instabili e più facilmente soggette al cambio conformazionale (Picken, 2020).

Fisiologicamente le proteine non conformate adeguatamente non si trovano nelle cellule perché il cambiamento di conformazione è il segnale per degradarle a livello intracellulare nei proteosomi e a livello extracellulare ad opera dei macrofagi.

Durante lo sviluppo di amiloidosi questo non avviene, il meccanismo di degradazione delle proteine è alterato perché il quantitativo delle misfolded-protein è molto elevato (Picken, 2020).

Nell'amiloidosi AA il fattore scatenante per la diffusione della malattia è la presenza di condizioni infiammatorie che causano nell'organismo la risposta di fase acuta (APR).

L'APR (acute-phase response) comprende un insieme di cambiamenti fisiologici che si verificano come conseguenza di infiammazioni, infezioni, traumi, neoplasie e altri eventi.

L'APR coinvolge molte risposte fisiologiche come febbre, cambiamenti ormonali e alterazioni metaboliche (Sack, 2018).

I cambiamenti nei livelli di proteine sieriche durante l'APR sono particolarmente notevoli, in particolare, le alterazioni dei livelli sierici di proteina C-reattiva (CRP) e di proteine e geni della famiglia SAA sono particolarmente evidenti. Fisiologicamente sia la CRP che la SAA sono presenti ma a livelli generalmente bassi: nel sangue di individui sani la SAA si trova normalmente a 20-50 mcg/ml. Tuttavia, i loro livelli possono aumentare fino a 1000 volte 24 ore dopo l'inizio dell'APR, a seguito di un aumento della loro produzione epatica. I livelli ematici di CRP e SAA diminuiscono rapidamente quando viene risolta la causa che porta alla

risposta di fase acuta. Il livello sierico di CRP è ampiamente utilizzato nella clinica come marcatore specifico di infiammazione (Sack, 2018).

La formazione di fibrille di amiloide AA (Figura 1.3) prevede un passaggio intracellulare obbligato. A partire dall'endocitosi mediata dalla clatrina, l'SAA raggiunge i lisosomi dove avviene la riorganizzazione strutturale con o senza proteolisi da parte della catepsina B. Si formano quindi oligomeri di SAA che lisano le membrane e portano alla tossicità cellulare. Infine si verifica la crescita extracellulare dei depositi e delle fibrille amiloidi patologicamente riconoscibili. Sebbene il componente più importante delle fibrille amiloidi patologiche sia il poli-peptide "AA" derivato dall'SAA, sono presenti anche altre molecole come i glicosaminoglicani eparinici e i dermatan solfati. Inoltre, tutte le fibrille amiloidi patogene contengono la glicoproteina plasmatica amiloide sierica P (SAP), un membro della famiglia delle pentrassine di cui fa parte anche la proteina CRP. La SAP contiene un sito di legame calcio dipendente che presenta alcune caratteristiche comuni a tutti i tipi di fibrille amiloidi (Sack, 2018).

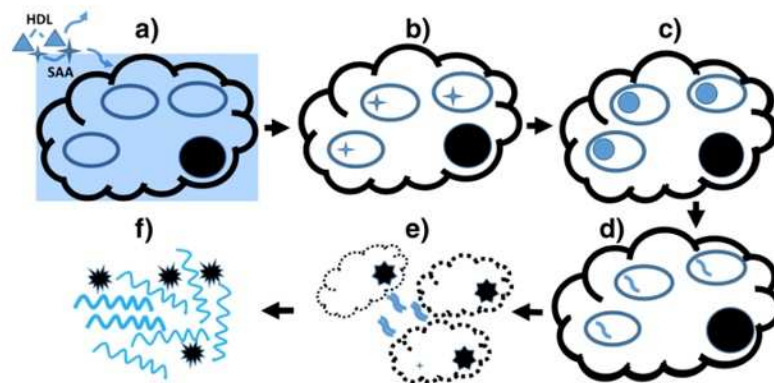


Figura 1.3: schema per la formazione di fibrille di SAA. a: La SAA legata all'HDL si dissocia dall'HDL. b: (S)AA entra attraverso la clatrina nell'ambiente lisosomiale a basso pH. c: I monomeri di (S)AA subiscono riarrangiamenti strutturali all'interno del lisosoma. d: Gli oligomeri di AA si formano all'interno delle cellule. e: La lisi delle membrane lisosomiali e cellulari porta alla formazione di oligomeri extracellulari e detriti dalle cellule necrotiche. f: gli oligomeri AA si raggruppano in fibrille e diventano visibili come depositi di amiloide tissutale con affinità alla colorazione Rosso Congo.

L'insulto principale dovuto all'accumulo di sostanza amiloide è rappresentato da un danno ischemico e da un danno atrofico.

L'accumulo di sostanza amiloide limita l'afflusso e soprattutto il deflusso sanguigno; in primo luogo si ha un'occlusione delle vene perché queste, rispetto alle arterie, sono soggette ad una minore pressione e perché le arterie, presentando una parete più rigida, hanno una

maggiore resistenza. Il flusso di sangue viene interrotto e il tessuto presenta un danno ischemico. Si avrà in conseguenza anche un danno atrofico. L'organo potrà apparire aumentato di volume perché ci sarà un accumulo di sostanza amiloide ma sarà un organo atrofico perché le cellule di questo tessuto si adattano alla diminuzione del flusso: ci sarà inizialmente atrofia conseguente ad ipossia, seguita poi da un'atrofia causata dalla compressione cellulare da parte della sostanza amiloide (Lustig & Galeotti, 1923).

Negli animali gli organi più comunemente coinvolti sono la milza, il fegato, i reni, e la mucosa gastrointestinale. I segni clinici dipendono dalla localizzazione e dalla quantità dei depositi e riflettono l'entità del danno d'organo. La malattia renale cronica è comune nei gatti Abissini e nei cani Shar-Pei malati, mentre nei gatti Siamesi è stata segnalata una maggiore disfunzione epatica (Ferri et al., n.d.).

Uno studio eseguito su 80 gatti riporta che tutti i gatti positivi a FIV, 70% di quelli positivi a FeLV, e il 50% di quelli positivi a FCoV presentavano AA-amiloidosi in almeno un organo. Tuttavia, l'analisi statistica non ha rivelato alcuna associazione tra le tre malattie infettive e la presenza di AA-amiloidosi (Ferri et al., n.d.).

Per quanto riguarda la trasmissibilità dell'amiloidosi AA, in alcune specie animali è stata dimostrata attraverso un meccanismo di nucleazione-dipendente simile a quello dei prioni. Inoltre, lo sviluppo dell'AA-amiloidosi nei topi sembra essere accelerato dalla somministrazione orale di fibrille amiloidi estratte da esseri umani e bovini affetti, portando all'ipotesi della trasmissibilità tra specie. La presenza di frammenti di SAA nella bile dimostra la loro presenza nelle feci dei gatti affetti e il peso molecolare dei frammenti di SAA trovati nei campioni di bile è compatibile con i frammenti estratti dal tessuto renale. Si pensa quindi che la trasmissione oro-fecale svolga un ruolo importante nello sviluppo dell'AA-amiloidosi negli animali in cattività (Ferri et al., n.d.).

1.1.4 DIAGNOSI ISTOLOGICA

La diagnosi di amiloidosi richiede la dimostrazione istologica dei depositi di amiloide. Ciò si ottiene mediante colorazione con il colorante Rosso Congo. L'amiloide colorata con Rosso Congo ha un aspetto rosso al microscopio ottico e produce una birifrangenza verde alla luce polarizzata. La sostanza amiloide è birifrangente per la sua composizione caratteristica in quanto la birifrangenza deriva dal passaggio del colorante Rosso Congo nelle fibrille

amiloidi; questa proprietà ottica deve essere presente per considerare la colorazione Rosso Congo positiva (Yakupova et al., 2019).

La colorazione con Rosso Congo può essere difficile se le sezioni di tessuto hanno uno spessore $<5 \mu\text{m}$. L'eccesso di colorazione del tessuto è un ulteriore problema potenziale che può produrre risultati falsi positivi. Al microscopio elettronico, l'amiloide appare come un insieme di fibrille non ramificate con un diametro di 8-10 nm. Le fibrille sono disposte in modo casuale senza un orientamento specifico. La dimensione delle fibrille differenzia l'amiloidosi da altre malattie con depositi organizzati.

L'aspetto micrografico elettronico delle fibrille amiloidi è molto caratteristico quindi se viene rilevato, la diagnosi di amiloidosi dovrebbe continuare ad essere presa in considerazione anche quando la colorazione Rosso Congo risulta negativa. La presenza di fibrille alla microscopia elettronica dovrebbe indurre una colorazione di conferma del tessuto con il colorante Rosso Congo tuttavia, anche quando viene eseguita la microscopia elettronica, la diagnosi di amiloidosi può dare un falso negativo se le fibrille sono scarse (Dember, 2006).

La diagnosi con tioflavina T, un'altra molecola che si lega alle fibrille amiloidi, viene utilizzata meno frequentemente del Rosso Congo. Il legame della tioflavina T all'amiloide produce una fluorescenza giallo-verde (Dember, 2006). Il metodo più diretto per identificare la proteina amiloidogena è la spettrometria di massa.

Il rene è frequentemente colpito nell'amiloidosi AA per cui la biopsia renale è spesso il metodo con cui viene identificata la malattia. Nei reni colpiti è stata spesso riscontrata la presenza di materiale eosinofilo amorfo nell'interstizio e/o nei glomeruli, un ispessimento multifocale della capsula di Bowman, un'atrofia o una perdita di nefroni, fibrosi e nefrite interstiziale cronica. La deposizione mesangiale può produrre noduli visibili macroscopicamente (Dember, 2006).

Per quanto riguarda l'accumulo epatico il reperto istopatologico più comune nei fegati affetti da AA-amiloidosi, sulla base di ematosilina ed eosina, è la deposizione di abbondante materiale eosinofilo tra gli epatociti e i sinusoidi, causando, quando abbondante, atrofia e spostamento degli epatociti con squilibrio dei cordoni epatici. In alcuni casi si è verificata anche una deposizione di fibrille a livello perivascolare. Invece, nella milza, sono stati riscontrati depositi eosinofili interstiziali e perivascolari spesso con conseguente ispessimento delle trabecole (Ferri et al., n.d.).

Uno studio riporta che la frequenza dell'amiloidosi AA è risultata simile nel fegato, nella milza e nel rene, con oltre il 70% dei casi osservati che mostravano depositi concomitanti nei tre organi. Nonostante il tasso comparabile, nei gatti colpiti i depositi erano più gravi nella milza rispetto al fegato e al rene, anche se la causa di morte nella maggior parte dei gatti con AA-amiloidosi è stata l'insufficienza renale conseguente a depositi di amiloide localizzati in diverse parti dell'organo (Ferri et al., n.d.).

Per tipizzare le principali forme di proteina amiloide (AA e AL) può essere utilizzato inoltre il permanganato di potassio con soluzione al 5%: l'AA amiloide si decolora e perde l'affinità con il Rosso Congo e la sua proprietà di birifrangenza, mentre AL amiloide mantiene le sue caratteristiche tintoriali.

1.2 PROTEOMICA E SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa (MS) è diventata una delle tecnologie più importanti per l'analisi del proteoma. Queste tecniche consentono l'identificazione e la quantificazione delle proteine da miscele complesse. Poiché la struttura delle proteine può essere molto più eterogenea di quella del DNA, le tecniche sperimentali della proteomica si sono evolute in modo diverso dalle tecniche di sequenziamento del DNA.

La spettrometria di massa è un metodo sensibile e misura la massa totale (massa totale (m) divisa per la carica (z)) di una molecola (ad esempio un peptide o una proteina). La frammentazione di peptidi e piccole proteine nello strumento consente l'identificazione delle proteine in base alla misurazione delle masse di questi prodotti di frammentazione e alla ricerca in database (Bruce et al., 2013).

Il principio su cui si basa la spettrometria è il seguente: una molecola viene ionizzata per espulsione di un elettrone, il catione radicalico che si forma (ione molecolare) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte genera cationi e/o radicali cationi (ioni frammento). Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector. L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella ionizzazione di molecole in fase gassosa, nella separazione dei diversi ioni prodotti e nella loro rivelazione. Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che

rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (Douglas A. Skoog et al., 2005).

Contrariamente ai metodi enzimatici e basati su anticorpi, la proteomica basata sulla spettrometria di massa misura gli spettri di massa e di frammentazione altamente accurati dei peptidi derivati dalla digestione specifica della sequenza delle proteine. Poiché le masse e le sequenze di questi peptidi sono uniche, la proteomica è intrinsecamente specifica.

La proteomica basata sulla SM può analizzare tutte le proteine in un sistema - il suo proteoma - ed è in questo senso imparziale e priva di ipotesi. Inoltre, i metodi MS sono ideali per scoprire e quantificare le modifiche post-traduzionali sulle proteine (Geyer et al., 2017).

Attraverso la spettrometria di massa quindi si possono ricercare dei possibili biomarcatori specifici di patologia. Il biomarcatore è una caratteristica definita che viene misurata come un indicatore di normali processi biologici, processi patogeni o una risposta a un'esposizione o intervento (Geyer et al., 2017).

1.3 SCOPO DELLO STUDIO

Con questo elaborato si valuta la possibilità di utilizzare l'analisi proteomica come mezzo per individuare dei biomarker sierologici utili nella diagnosi non-invasiva di amiloidosi AA nel gatto.

Il presente studio di analisi proteomica sul siero di gatti con amiloidosi ha lo scopo di verificare se i gatti malati sono diversi dai gatti sani per quanto riguarda il profilo proteico circolante.

2. MATERIALI E METODI

2.1 CASI E CRITERI DI INCLUSIONE DEI DATI

Lo studio è stato eseguito su 10 gatti Europei provenienti da 3 differenti gattili del Nord Italia. I soggetti venivano inclusi nello studio solamente se la morte era avvenuta spontaneamente o se erano stati soppressi a causa delle loro gravi condizioni cliniche.

Gli esami svolti sui gatti presenti in questo studio sono stati eseguiti dal 2016 al 2019 con differenze per ogni gatto. Oltre all'analisi proteomica sono stati eseguiti anche un esame emocromocitometrico, un esame biochimico e un'ecografia addominale, post-mortem è stato eseguito un esame istopatologico su milza, fegato e reni. I referti degli esami di 2 gatti su 10 non sono disponibili.

I dati riguardanti il genere, l'età di arrivo al gattile, la durata della permanenza in gattile, la causa di morte, l'età alla morte e la presenza di patologie concomitanti sono stati ottenuti dalle anamnesi raccolte.

2.2 ESAMI DI LABORATORIO PER L'ANALISI PROTEOMICA

Per la preparazione dei campioni di plasma di gatto per la spettrometria di massa vengono eseguiti 4 passaggi fondamentali che comprendono la lisi cellulare, la riduzione-alcilazione-digestione, la precipitazione dell'SDS e l'estrazione della fase solida (SPE).

2.2.1 LISI CELLULARE

Si aggiungono a 6 μ l di plasma, 200 μ l di RIPA Buffer. Nel plasma non dovrebbero essere presenti cellule del sangue ma utilizzando il RIPA Buffer con SDS si solubilizzano gli eventuali complessi proteici presenti. A questo punto si sonica 5 volte: quando si sonica si mandano delle onde ad una determinata lunghezza d'onda che andranno a rompere le pareti cellulari in modo fisico e non chimico. Successivamente si agita su ruota a 4°C per 15' in frigorifero. Infine bisogna quantificare con metodica Bradford per sapere quanti microgrammi di proteine sono presenti nel campione.

Il saggio di Bradford è una procedura analitica strumentale per la determinazione del contenuto in proteine di una soluzione. Il metodo è basato sullo shift in assorbanza del

colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 in cui in condizioni acide la forma rossa del colorante è convertita nella sua forma blu quando si lega alla proteina da analizzare. Il legame della proteina stabilizza la forma blu del colorante; quindi la quantità del complesso presente in soluzione è una misura della concentrazione della proteina e può essere stimato tramite l'uso della lettura di un'assorbanza tramite lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. L'aumento in assorbanza a 595 nm è proporzionale alla quantità di colorante legato e quindi alla concentrazione della proteina presente nel campione (Ernst & Zor, 2010).

2.2.2 RIDUZIONE, ALCHILAZIONE, DIGESTIONE

Una volta quantificate le proteine del campione si seleziona un volume corrispondente a 100 microgrammi di proteine e si procede con riduzione, alchilazione e digestione. Bisogna ridurre i ponti di solfuro e alchilarli in modo che la tripsina riesca ad agire.

Vengono aggiunti alle proteine:

- 25 µl di AmBic per mantenere il ph
- 15 µl TFE (trifluoroethanol) per la riduzione
- 2,5 µl DTT (dithiothreitol) per l'alchilazione

A questo punto si incuba per 45' a 60°C. Successivamente si aggiungono 10 µl di IAM (iodoacetamide), si incuba 1h al buio per evitare l'ossidazione a RT. Poi vanno aggiunti 2,5 µl DTT incubando per 1h al buio a RT.

Vengono aggiunti poi:

- 100 µl di AmBic
- 200 µl H₂O
- 10 µl Tripsina [0,2 µg/ µl]

Lo strumento di analisi elabora solamente i peptidi quindi le proteine devono essere ridotte: per questo viene utilizzata la tripsina che viene lasciata reagire per 12h a 37 gradi.

Il giorno seguente bisogna bloccare la reazione con 2 µl di Acido Formico (AF) in quanto l'acidità blocca l'attività dell'enzima e si portano a secco le proteine in speedvac. Lo speedvac è una centrifuga dove si mettono le provette aperte ad una temperatura di circa 60 gradi. La centrifuga inizia a girare dividendo il precipitato dal surnatante, avviene l'evaporazione del surnatante mentre il precipitato composto da peptidi rimane in provetta.

Un ulteriore passaggio prevede la precipitazione dell'SDS del RIPA Buffer perché questo è incompatibile con la massa.

2.2.3 PRECIPITAZIONE SDS

Si inizia risospendendo i peptidi precedentemente portati a secco in speedvac in 200 µl di fase mobile costituita da 0,1% di Acido Formico in H₂O, si aggiungono poi 100 µl di KCl 4M lasciando in incubazione per 5' a RT.

A questo punto si centrifuga a 14000xg per 10' a RT ottenendo un precipitato che sarà l'SDS. Si preleva il surnatante, ottenendo peptidi privi di SDS, e si aggiungono 200 µl di FM. Infine si procede con SPE.

2.2.4 SOLID PHASE EXTRACTION (SPE) con Discovery DSC-18 solid phase extraction (Sigma)

L'estrazione in fase solida (SPE) è una tecnica ideata per una rapida e selettiva preparazione e purificazione del campione. La preparazione del campione via SPE converte la matrice originale del campione in una più semplice. Ciò rende il campione più adatto per la successiva analisi cromatografica. Questo sistema prevede delle colonne che hanno un'affinità per i peptidi ad un determinato pH. Inizialmente si equilibrano le colonnine con 1 ml di ACN (acetonitrile) lavando poi con 2 ml di acqua. Ad un determinato pH il peptide rimane legato mentre ciò in cui era immerso il peptide viene perso, a questo punto si carica il campione e lo si fa passare nella colonnina lavando poi con 1 ml di acqua.

In seguito si deve eluire ciò che è rimasto adeso alle colonnine con ACN (acetonitrile) al 80% perché con questo passaggio le proteine perdono affinità per le colonnine ma acquistano affinità per il liquido in cui vengono eluite. Quindi ora le proteine si troveranno in una provetta pulita con ACN 80%.

Per mettere in massa si deve utilizzare un nuovo buffer quindi si fa evaporare l'acetonitrile portando a secco a 60 gradi.

Si ottengono così i peptidi quantificati, pronti per essere iniettati in massa. Vengono prima aggiunti in fase mobile (0,1 % acido formico in acqua) e poi iniettati nello strumento.

I peptidi sono stati analizzati allo spettrometro di massa Orbitrap LC-MS | Thermo Fisher Scientific. I dati risultanti sono stati analizzati utilizzando il software MaxQuant per ottenere identificazioni e quantificazione.

2.3 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO, BIOCHIMICO, URINARIO

Ai gatti di questo studio sono stati eseguiti degli esami ematobiochimici completi, esami delle urine, ecografia addominale ed esame istologico post-mortem.

Nelle tre tabelle si riportano i range di riferimento fisiologici per ogni valore stimato con l'esame emocromocitometrico, con l'esame biochimico e con l'esame urinario.

Gli intervalli di riferimento considerati sono stati presi dal laboratorio IDEXX, dove gli esami sono stati svolti.

Esame emocromocitometrico (Figura 2.1):

materiale: Sangue con EDTA

Quadro ematico completo

Leucociti	3.9 - 19	G/l
Eritrociti	7.1 - 11.5	T/l
Emoglobina	10.3 - 16.2	g/dl
Ematocrito (Hct)	28.2 - 52.7	%
MCV	39 - 56	fl
MCH	12.6 - 16.5	pg
MCHC	28.5 - 37.8	g/dl
Piastrine	155 - 641	G/l
Reticolociti		%
Reticolociti (assoluti)		/ul
Linee guida per la valutazione della rigenerazione midollare (reticolociti/ul):		
< 50.000	normale in caso di paziente non anemico	
< 50.000	inadeguata in caso di paziente anemico	
50.000-75.000	rigenerazione lieve	
75.000-175.000	rigenerazione moderata	
> 175.000	rigenerazione marcata	
La conta reticolocitaria dovrebbe sempre essere interpretata in associazione al grado di anemia.		
Emoglobina reticolocitaria	15.3 - 22.9	pg

Figura 2.1: Referto esame emocromocitometrico laboratorio IDEXX

Esame biochimico (Figura 2.2):

materiale: Siero

Check-up completo

Reni:

SDMA (EIA)	0 - 14	µg/dl
Creatinina	0.9 - 2.3	mg/dl
Urea-N (BUN)	16 - 38	mg/dl
Sodio	147 - 159	mmol/l
Cloruro	109 - 129	mmol/l
Potassio	3.3 - 5.8	mmol/l
Fosfati	0.8 - 2.2	mmol/l

Fegato:

Bilirubina totale	0 - 0.4	mg/dl
ALT (GPT)	27 - 175	U/l
Fosfatasi alcalina	12 - 73	U/l
GGT	0 - 5	U/l
AST (GOT)	14 - 71	U/l
GLDH	0 - 11	U/l
Proteine totali	59 - 87	g/l
Albumina	27 - 44	g/l
Globuline	29 - 54	g/l
Rapp. albumina/globuline	> 0.57	

Pancreas:

Glucosio	63 - 140	mg/dl
Lipasi	0 - 45	U/l
Colesterolo	86 - 329	mg/dl

Colesterolo (Gatti di peso medio a digiuno): < 200 mg/dl

Figura 2.2: Referto esame biochimico laboratorio IDEXX

Esame urinario (Figura 2.3):

materiale: Urine

Profilo Urinario Esame Add-On

Urine chimico-fisico

Nitriti	negativo
pH	5.0 - 7.5
Proteine	negativo
Glucosio	negativo
Corpi chetonici	negativo
Urobilinogeno	negativo a +
Bilirubina	negativo a +
Sangue/Hgb/Mgb	negativo
Peso specifico (urina)	
Colore	gelb
Giallo oro	
Trasparenza	klar

Sedimento

Gocciolate lipidiche	
Eritrociti	0-1 /hpf
Leucociti	0-5 /hpf
Cellule epiteliali	0-5 /hpf
Cristalli	negativo
Cilindri	negativo
Rapporto proteine/creatinina	< 0.33

Figura 2.3: Referto esame urinario laboratorio IDEXX

In base a questi riferimenti sono state eseguite le valutazioni dei gatti di colonia analizzati per questa ricerca.

3. RISULTATI

3.1 RISULTATI DEGLI ESAMI EMATOBIOCHIMICI

Sono stati eseguiti e sono disponibili gli esiti degli esami ematobiochimici e urinari (Tabella 3.1 e Tabella 3.2) di 8 dei 10 gatti totali considerati per la ricerca di biomarker per l'amiloidosi.

Per ogni valore analizzato è stato segnato “+” se il gatto considerato presentava un aumento del valore in almeno una delle misurazioni effettuate, è stato segnato “-” se il gatto considerato presentava una diminuzione del valore in almeno una misurazione effettuata e infine è stato segnato “norm” se il valore rientrava nell'intervallo di riferimento fisiologico. I gatti 1,2,3,4, e 5 sono positivi ad amiloidosi, i gatti 6,7,8 sono sani.

	Crea	BUN	SDMA	Na	K	P	USG	PU/CU	sedimento
Gatto 1	norm	+	+	+	norm	norm	-	+	neg
Gatto 2	+	+	+	-	+	+	-	+	Glicosuria Ematuria k. pneumonie
Gatto 3	+	+	+	norm	norm	+	-	+	bil
Gatto 4	norm	norm	+	-	norm	norm	-	norm	Bil nitriti
Gatto 5	+	+	+	+	norm	+	-	+	neg
Gatto 6	+	+	+	+	norm	+	-	+	neg
Gatto 7	norm	+	+	-	norm	norm	-	+	neg
Gatto 8	+	+	+	-	norm	+	-	+	E.coli

Tabella 3.1: Esiti degli esami ematobiochimici e urinari

	PAS	Alb	Tbil	TP	Hct	RBC	WBC
Gatto 1	/	norm	norm	norm	-	-	+
Gatto 2	norm	-	+	+	-	-	+
Gatto 3	/	-	norm	+	-	-	+
Gatto 4	/	-	+	+	-	-	+
Gatto 5	/	norm	norm	+	-	-	+
Gatto 6	/	-	norm	+	-	-	norm
Gatto 7	/	-	+	+	-	-	norm
Gatto 8	/	-	norm	norm	norm	norm	+

Tabella 3.2: Esiti degli esami ematobiochimici e urinari

3.1.1 ANALISI DELLE ALTERAZIONI RICONTRATE

ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

HCT

L'ematocrito indica la percentuale di volume sanguigno occupata dagli eritrociti.

Una diminuzione dell'ematocrito si può riscontrare principalmente nel caso di emorragie o in presenza di malattie ematologiche come l'anemia.

RBC

La conta RBC quantifica il numero totale di globuli rossi presenti nel soggetto.

Una diminuzione di questo valore può essere legata a patologie ematologiche, come l'anemia, oppure a disfunzioni renali croniche responsabili della diminuzione dell'eritropoietina.

L'eritropoietina è un ormone prodotto dai reni che stimola la produzione di globuli rossi da parte del midollo osseo.

WBC

Con WBC si stimano i leucociti totali. Un aumento di questo valore indica la presenza di leucocitosi (aumento in numero assoluto dei globuli bianchi), indice di stato infettivo-infiammatorio in corso.

ESAME BIOCHIMICO

CREATININA

La creatinina ematica ha dimensioni piccole, 113 D, non si lega a proteine e circola liberamente nel plasma. Viene completamente filtrata dal glomerulo, ma, a differenza dell'urea, non viene riassorbita dai tubuli renali e dai dotti escretori ed è quindi considerata un migliore indicatore del tasso (o velocità) di filtrazione glomerulare (GFR) rispetto all'urea. La sua misurazione serve quindi per valutare la funzionalità renale. Un suo aumento può significare la presenza di un danno che riduce la normale capacità di filtrazione glomerulare come per esempio una diminuzione della perfusione renale o un ostruzione/rottura delle vie urinarie.

I livelli di creatinina sono però influenzati dalla dieta, dalla velocità di sintesi e soprattutto dalla massa muscolare totale.

BUN

L'urea è sintetizzata nel fegato attraverso il ciclo dell'urea a partire da anidride carbonica e ammonio. Diffonde liberamente nei tessuti essendo idrosolubile e di piccole dimensioni e viene completamente filtrata a livello glomerulare. È quindi un buon indicatore del tasso di filtrazione glomerulare (GFR). La concentrazione plasmatica dell'urea è la risultante della produzione da parte dell'organismo, del GFR e del flusso dell'ultrafiltrato nei tubuli renali. L'iperazotemia può essere prerenale, renale o post renale. L'iperazotemia prerenale può essere causata da una ridotta perfusione renale (come nel caso di disidratazione, shock o cardiopatie) o da un'aumentata produzione ad esempio in caso di aumentato catabolismo proteico o in caso di aumentata assunzione con la dieta. L'iperazotemia renale è causata invece da insufficienza renale acuta o cronica. Infine, l'iperazotemia post renale può essere dovuta a una riduzione del GFR per ristagno di urina nel caso di ostruzioni delle vie urinarie. Tra le cause di diminuzione dell'urea possiamo considerare: una sua ridotta produzione causata da insufficienza epatica o una sua aumentata eliminazione renale causata da un elevato flusso renale tubulare per iperidratazione, polidipsia primaria, diabete insipido.

SDMA

Il test SDMA è un indicatore della funzionalità renale più affidabile della creatinina, in particolare perché il test SDMA identifica la ridotta funzionalità renale precocemente e non è influenzato dalla massa muscolare come la creatinina. Negli stadi iniziali di malattia renale la creatinina rimane spesso all'interno dell'intervallo di riferimento mentre negli stadi più avanzati può essere falsamente diminuita in soggetti con una ridotta massa muscolare. L'SDMA è quindi un parametro precoce di diagnosi di insufficienza renale nel cane e nel gatto.

Na

Un aumento dei livelli di natriemia può essere dovuto a perdite di acqua e fluidi corporei per perdite renali (diabete insipido centrale o nefrogeno, patologie renali, utilizzo di diuretici o diuresi post ostruttiva), per perdite respiratorie (iperventilazione, febbre) o per perdite gastroenteriche (vomito, diarrea). Oppure per una diminuita eliminazione di sodio come in caso di iperaldosteronismo o iperadrenocorticismo.

Una iponatriemia si può riscontrare in casi di eccessiva ritenzione di acqua come in seguito a insufficienza cardiaca congestizia, sindrome nefrosica o polidipsia psicogena. Si riscontra anche in caso di eccessiva perdita di sodio: si possono avere perdite gastrointestinali (vomito,

diarrea), perdite renali (ipoadrenocorticismo, patologie renali, diuresi osmotica) e perdite nel terzo spazio (ascite, versamenti). Infine in caso di diabete mellito si ha uno shift di acqua dal fluido intracellulare a quello extracellulare diminuendo la concentrazione di sodio.

K

Tra le cause di iperkaliemia si considera principalmente un aumento della sua assunzione come nel caso di supplementazione terapeutica, una ridotta escrezione renale per insufficienza renale con oliguria/anuria, per ostruzione o rottura delle vie urinarie e nel caso di ipoadrenocorticismo/ipoaldosteronismo.

P

La fosfemia è una misurazione del fosforo inorganico presente a livello sierico. Un aumento dei suoi livelli può essere causato da un aumentato assorbimento intestinale o da una ridotta secrezione renale. Una riduzione della secrezione renale si può avere per riduzione della velocità di filtrazione glomerulare, per rottura delle vie urinarie e per ipoparatiroidismo primario. Un aumentato assorbimento intestinale può avere luogo in animali che presentano diete ricche di fosforo o in caso di ipervitaminosi D.

ALBUMINA

Una ipoalbuminemia può essere causata da una diminuita produzione di albumina o può essere legata a delle perdite in caso di insufficienza/danno renale e sindrome nefrosica.

Una ridotta produzione si può riscontrare in caso di insufficienza epatica cronica, di iper gamma-globulinemia (l'aumento eccessivo delle gamma globuline oltre una certa soglia comporta un aumento di pressione colloidosmotica e un blocco della produzione epatica di albumina), in situazioni di digiuno prolungato, in caso di maldigestione (nel caso di insufficienza pancreatica esocrina le proteine non si scindono nell'intestino e gli aminoacidi essenziali non vengono assorbiti), in caso di infiammazione (è una proteina negativa della fase acuta).

Invece, nella sindrome nefrosica, aumentano la permeabilità e la soglia di filtrazione glomerulare e la proteina viene persa, questo può succedere in presenza di: enteropatie proteino-disperdenti (infiammazioni gravi dell'intestino tenue con perdita di proteine nelle feci e mancato assorbimento di aminoacidi), emorragie, ipovolemia.

BILIRUBINA TOTALE

Un aumento dei valori di bilirubina può essere dovuto a cause pre-epatiche, a cause epatiche e a cause post epatiche. Le cause pre-epatiche riguardano in particolare le anemie emolitiche di varia natura che fanno sì che aumenti la produzione di bilirubina non coniugata per aumento della distruzione eritrocitaria. Le cause epatiche comprendono patologie come: epatopatie (degenerative, tossiche), epatiti infettive e non infettive, neoplasie, malattie fibrotiche come la cirrosi e amiloidosi, in questi casi si ha una ridotta capacità del fegato di captare, coniugare e secernere bilirubina nei canalicoli biliari. Le cause post epatiche comprendono principalmente le ostruzioni intra ed extra epatiche (colelitiasi, neoplasie pancreatiche, parassitosi, colangiti) dove abbiamo una ridotta eliminazione di bile con colestasi intraepatica secondaria.

PROTEINE TOTALI

Questo esame misura la quantità totale dei vari tipi di proteine nel sangue. Le proteine sono costituenti importanti di tutte le cellule e dei tessuti; sono necessarie per la crescita, lo sviluppo e la salute dell'animale. Hanno funzione strutturale all'interno della maggior parte degli organi, oltre a costituire gli enzimi e gli ormoni che regolano le funzioni dell'organismo.

Le proteine totali possono aumentare in presenza di patologie che aumentano in modo eccessivo la produzione di proteine (es. condizioni infiammatorie, mieloma multiplo) e disidratazione.

In conclusione, considerando gli esami ematobiochimici, si constata che nei gatti con amiloidosi non ci sono particolari differenze rispetto ai gatti senza amiloidosi. Solo considerando il valore di WBC si osserva che in tutti i gatti con amiloidosi questo è aumentato, mentre in due animali su tre senza amiloidosi questo è normale. Essendo WBC indice aspecifico di infiammazione e infezione non può essere considerato un valore indicativo della presenza di amiloidosi.

ESAME DELLE URINE

PESO SPECIFICO URINARIO

Il peso specifico urinario viene utilizzato per valutare in maniera indiretta la capacità dei reni di concentrare o diluire l'ultra-filtrato glomerulare.

La capacità dei tubuli renali di concentrare o diluire l'urina è uno dei meccanismi omeostatici più importanti del rene. Con un bilancio di acqua ed elettroliti stabile, un peso specifico > 1035 è indice di una sufficiente capacità renale di concentrazione.

RAPPORTO PU/CU

La concentrazione delle proteine urinarie viene rapportata a quella della creatinina urinaria perché, essendo la creatinina escreta in maniera costante e non venendo riassorbita, tende a eliminare l'effetto del volume e della concentrazione di urine.

La proteinuria nei cani e gatti è causata soprattutto da glomerulonefrite o amiloidosi renale. Il rapporto PU/CU non è significativo in caso di sedimento urinario attivo perché questo è segno di infiammazione alle vie urinarie, spesso conseguente ad infezioni batteriche. Tutte le principali forme di glomerulopatia, quali l'amiloidosi renale, le glomerulopatie immunomediate associate a malattie infettive (per esempio la leishmaniosi), le glomerulopatie autoimmuni e le glomerulopatie su base genetica, hanno in comune la perdita di selettività della membrana glomerulare che si traduce nel passaggio nell'ultrafiltrato, e poi nelle urine, di una maggiore quantità di proteine caratterizzando una nefropatia proteino-disperdente.

SEDIMENTO

L'analisi del sedimento permette di interpretare meglio i risultati dell'esame chimico-fisico delle urine. Inoltre permette di identificare la presenza e il tipo di cristalluria, la presenza di ematuria, di batteriuria, la presenza di elementi cellulari anormali e la presenza di cilindri.

3.2 RISULTATI ESAMI ECOGRAFICI E ISTOLOGICI

Ai gatti sono stati eseguiti anche degli esami ecografici intravitali e degli esami istologici post-mortem principalmente su fegato, milza e rene. I risultati sono osservabili in Tabella 3.3 e in Tabella 3.4. I gatti 1,2,3,4 e 5 sono positivi ad amiloidosi mentre i gatti 6,7 e 8 sono negativi.

Tabella 3.3: Referto esame ecografico

	REFERTO ESAME ECOGRAFICO
Gatto 1	Le alterazioni presenti sono: presenza di versamento addominale anecogeno, presenza di infarti renali, una lieve distensione gastrica, micromineralizzazioni della ghiandola surrenale destra, un aumento di dimensioni dei linfonodi mesenterici e presenza di contenuto anecogeno in vescica.
Gatto 2	Presenza di versamento addominale anecogeno, presenza di nefrite/pielonefrite bilaterale con caratteristiche di cronicità. Sospetta colangite. Enteropatia diffusa associata a linfadenopatia regionale, presenza di fango biliare.
Gatto 3	Minimo versamento addominale anecogeno. Si osserva corticale renale iperecogena e completa perdita della distinzione cortico-midollare a carico di entrambi i reni, sono visibili alcune mineralizzazioni renali bilaterali. Pielectasia anecogena sinistra. Presenza di infarti renali corticali multifocali bilaterali.
Gatto 4	Enteropatia diffusa di lieve entità compatibile in prima ipotesi con un processo infiammatorio (enterite/ colite). Alterazione renale bilaterale di natura da accertare; in prima ipotesi si considera un processo infiammatorio. Epatomegalia di natura da accertare.
Gatto 5	Minima presenza di versamento addominale anecogeno. Il fegato si presenta con ecostruttura eterogenea per la presenza di una area ipoecogena con aspetto severamente eterogeneo. Nella colecisti presenza di fango biliare. I reni presentano un incremento dell'ecogenicità corticale e presenza di infarti bilaterali. È presente una minima pielectasia bilaterale.
Gatto 6	Presenza di minimo versamento anecogeno peri-renale bilaterale. Restanti strutture esaminate nei limiti della norma

Gatto 7	Presenza di reni con corticale eterogenea per la presenza di spots iperecogeni multifocali e a carico della corticale del rene sinistro presenza di un'area millimetrica, rotondeggiante anecogena e con rinforzo di parete posteriore.
Gatto 8	Al gatto 8 non sono state eseguite ecografie.

Considerando gli esami ecografici si nota che nei gatti con amiloidosi c'è la presenza di versamento addominale, i reni sono caratterizzati da infarti renali e nefrite con perdita della distinzione cortico midollare e mineralizzazioni. È presente inoltre enteropatia e linfadenomegalia.

Nei gatti senza amiloidosi non si riscontrano particolari alterazioni ad eccezione di un gatto che presenta spots iperecogeni nella corticale renale.

Tabella 3.4: Referto esame istologico

	REFERTO ESAME ISTOLOGICO
Gatto 1	Nel fegato è presente infiltrato linfoplasmacellulare multifocale lieve. Nella milza è presente un ispessimento eosinofilo delle arterie, suggestivo di amiloide, e del materiale rifrangente nella parete vascolare ed interstizio. Il rene presenta una nefrite interstiziale disseminata moderata, sono presenti cristalli nei tubuli e abbondante materiale eosinofilo suggestivo di amiloide interstiziale e glomerulare. Tutti e tre gli organi si negativizzano con permanganato.
Gatto 2	Il fegato presenta lievi depositi diffusi sinusoidali e capsulari con colangite lieve diffusa. La milza, positiva alla colorazione con permanganato, presenta depositi di amiloide vascolari, capsulari e interstiziali. Il rene, permanganato negativo, presenta depositi di amiloide perivascolare e peritubulare con aree caratterizzate da abbondante deposito di materiale eosinofilo non sempre positivo alla colorazione Rosso Congo.
Gatto 3	Nel fegato è stata rilevata lipidosi, iperplasia delle cellule di Ito a livello centrolobulare e una pigmentazione patologica centrolobulare. Nella milza è stata osservata iperplasia follicolare disseminata grave. Nel rene è presente nefrite interstiziale moderata, con presenza di cristalli intratubulari, proteinuria e glomeruli espanso da sospetta amiloidosi.

Gatto 4	<p>Nel fegato è presente amiloidosi epatica con colorazione Rosso Congo positiva e colorazione permanganato negativa. Nella milza la colorazione con Rosso Congo è positività per amiloide in sede perivascolare.</p> <p>Sospetta amiloidosi intestinale: colorazione Rosso Congo positiva, permanganato negativa. Nel rene c'è deposizione di materiale ialino con flogosi linfoplasmacellulare, atrofia tubulare e glomerulare con glomerulosclerosi. Si osservano depositi di materiale ialino intorno ai capillari glomerulari. Il rene risulta Rosso Congo e permanganato positivo.</p>
Gatto 5	<p>Nel fegato è presente del materiale positivo alla colorazione Rosso Congo con debole rifrangenza in sede subsinusoidale. Nella milza è presente della sostanza eosinofila Rosso Congo positiva e permanganato negativa, sospetto amiloide AA.</p> <p>Nel rene è presente nefrite interstiziale con glomeruli sclerotici, proteinuria e ispessimento della capsula di Bowmann. È presente del materiale Rosso Congo positivo. La colorazione Rosso Congo è positiva mentre quella con permanganato è negativa. Sospetta amiloide AA. Il digiuno è Rosso Congo positivo e permanganato negativo.</p>
Gatto 6	<p>Il fegato presenta una degenerazione vacuolare, un'iperplasia arteriolare, un infiltrato periportale e una congestione subcapsulare e nei sinusoidi. La colorazione con Rosso Congo è negativa.</p> <p>Nel rene si trovano frequenti cristalli intratubulari. Colorazione con Rosso Congo per amiloide negativa.</p>
Gatto 7	<p>Il fegato presenta pigmentazione negli epatociti centrolobulari, un'iperplasia dei dotti biliari e la presenza di lipogranulomi.</p> <p>Nella milza è presente un'emopoiesi extramidollare, un'iperplasia plasmacellulare e un'iperplasia follicolare.</p> <p>Nel rene è presente nefrite interstiziale con mineralizzazioni multifocali. È stata rilevata inoltre proteinuria, ispessimento della capsula di bowman e peritubulare e la presenza di materiale amorfo perivascolare.</p>

Gatto 8	<p>Nel fegato è presente una flogosi cronica perivascolare e un'iperplasia biliare con lieve infiltrato linfoplasmacellulare. La colorazione con Rosso Congo è negativa.</p> <p>Nella milza è presente iperplasia plasmacellulare e c'è un ispessimento delle pareti delle arterie. Colorazione con Rosso Congo negativa.</p> <p>Nel rene sono presenti mineralizzazioni e infiltrati interstiziali. La colorazione Rosso Congo è negativa.</p>
---------	---

Considerando gli esami istologici si nota che i gatti con amiloidosi presentano depositi di amiloide diffusi in fegato, milza e rene.

Dall'analisi proteomica è risultato che le proteine meno espresse nei gatti con amiloidosi sono:

- alpha-2-antiplasmin isoform X2
- inhibitor of carbonic anhydrase-like
- fibulin-1 isoform X2
- angiotensinogen
- Ig lambda variable

Le proteine più espresse nei gatti con amiloidosi invece sono:

- alpha-enolase isoform X2
- complement C3-like isoform X2
- insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit isoform X2
- apolipoprotein C-1.

3.3.1 PROTEINE MENO ESPRESSE NEI GATTI AA+

In Figura 3.2 e 3.3, sono riportati rispettivamente i livelli di Alpha-2-antiplasmina e Angiotensinogeno in gatti AA+ e AA-.

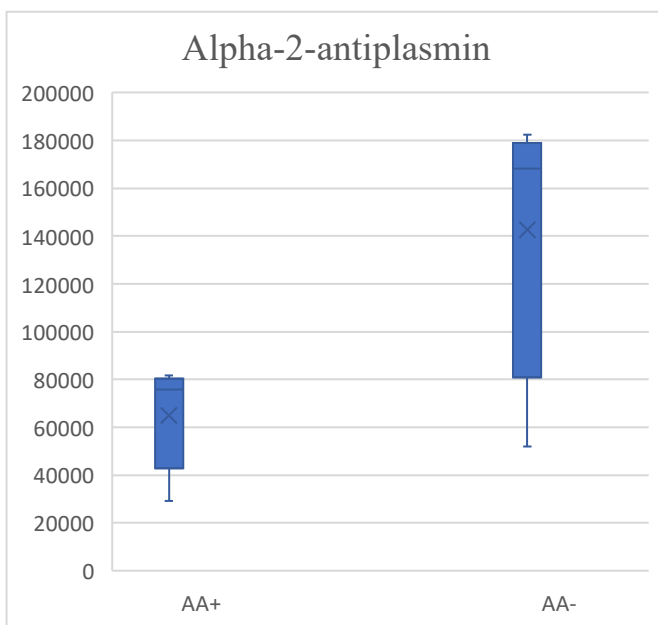


Figura 3.2: Livelli di Alpha-2-antiplasmina in gatti AA+ e AA-

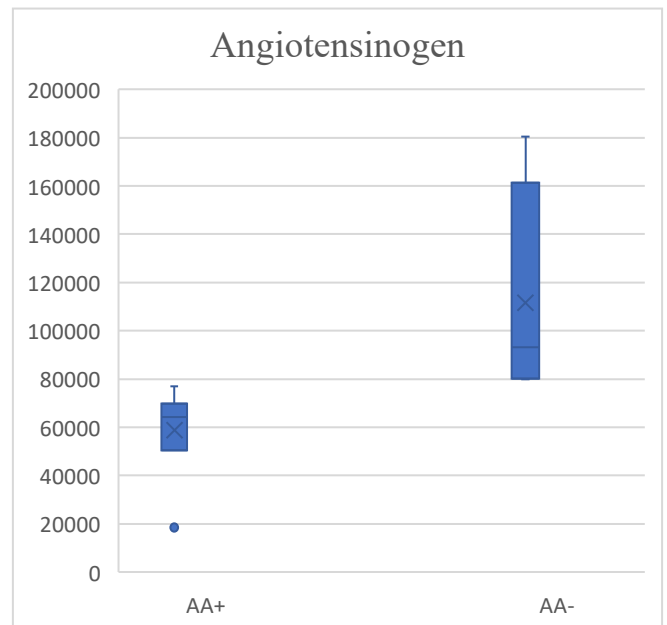


Figura 3.3: Livelli di Angiotensinogeno in gatti AA+ e AA-

In Figura 3.4 e 3.5, sono riportati rispettivamente i livelli di Ig λ e di Inibitore di anidraasi carbonica in gatti AA+ e AA-.

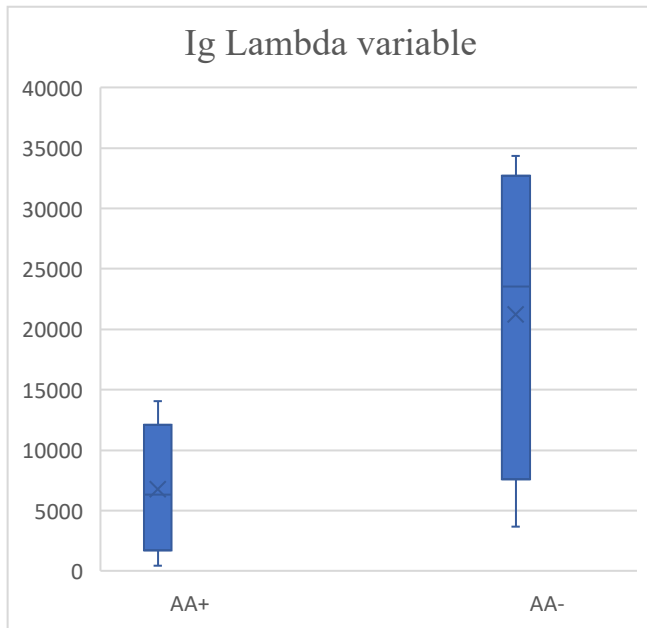


Figura 3.4: Livelli di Ig λ in gatti AA+ e AA-

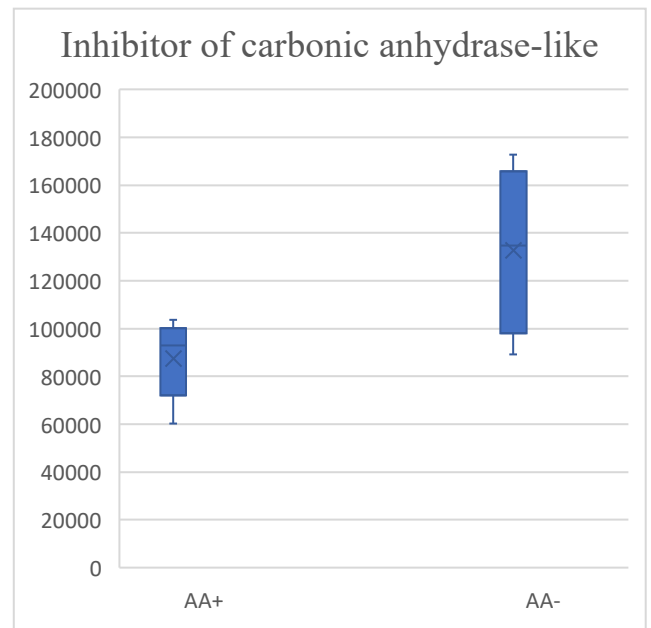


Figura 3.5: Livelli di Inibitore di anidraasi carbonica in gatti AA+ e AA-

In Figura 3.6 sono riportati i livelli di Fibulina-1 in gatti AA+ e AA-.

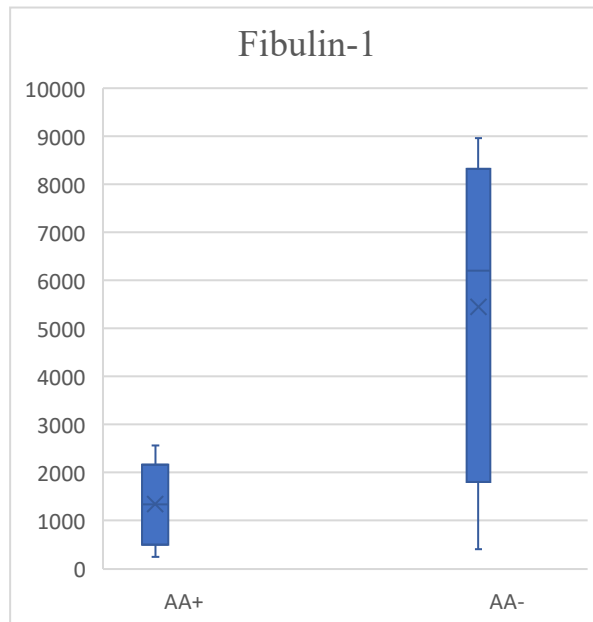


Figura 3.6: Livelli di fibulina-1 in gatti AA+ e AA-

3.3.2 PROTEINE PIU' ESPRESSE NEI GATTI AA+

In Figura 3.7 e 3.8, sono riportati rispettivamente i livelli di Alpha-enolasi e del complemento C3 in gatti AA+ e AA-.

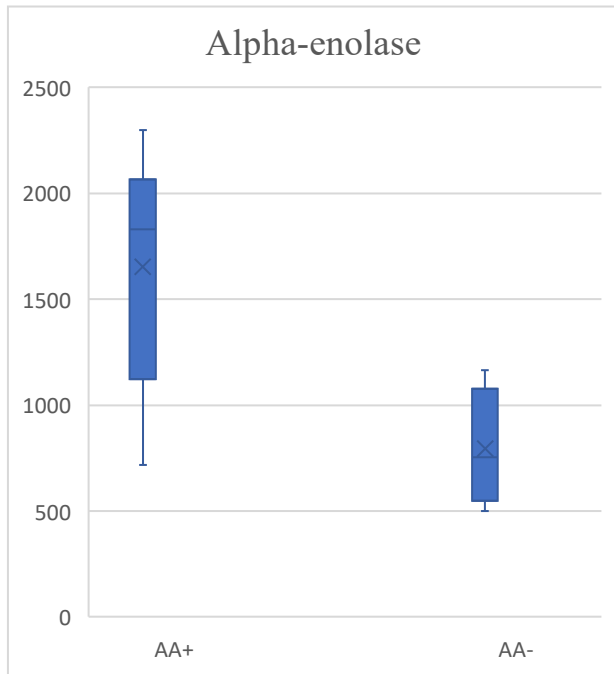


Figura 3.7: Livelli di Alpha-enolasi in gatti AA+ e AA-

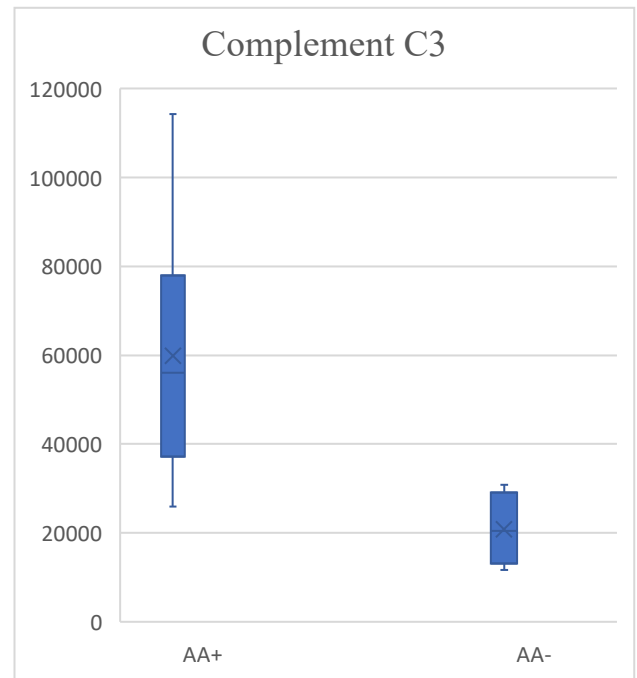


Figura 3.8: Livelli del complemento C3 in gatti AA+ e AA-

In Figura 3.9 e 3.10, sono riportati rispettivamente i livelli di Insuline-like growth factor binding protein e di Apolipoprotein C1 in gatti AA+ e AA-

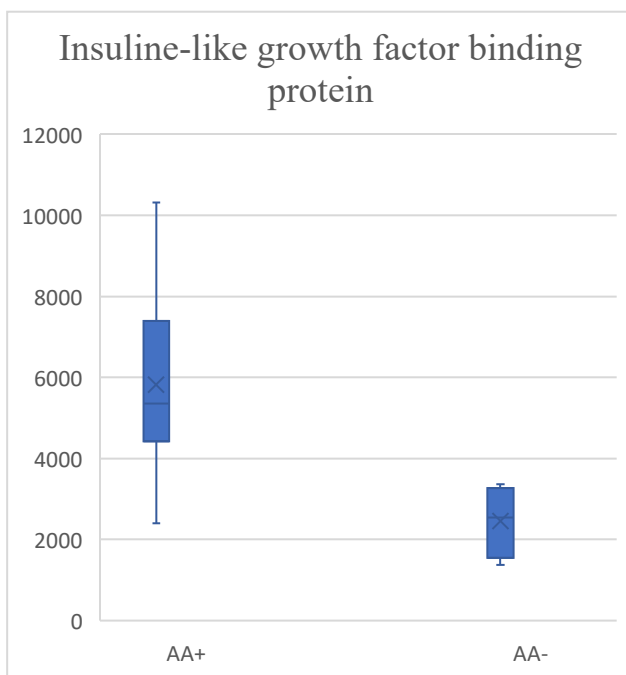


Figura 3.9: Livelli di Insuline like growth factor binding protein in gatti AA+ e AA-

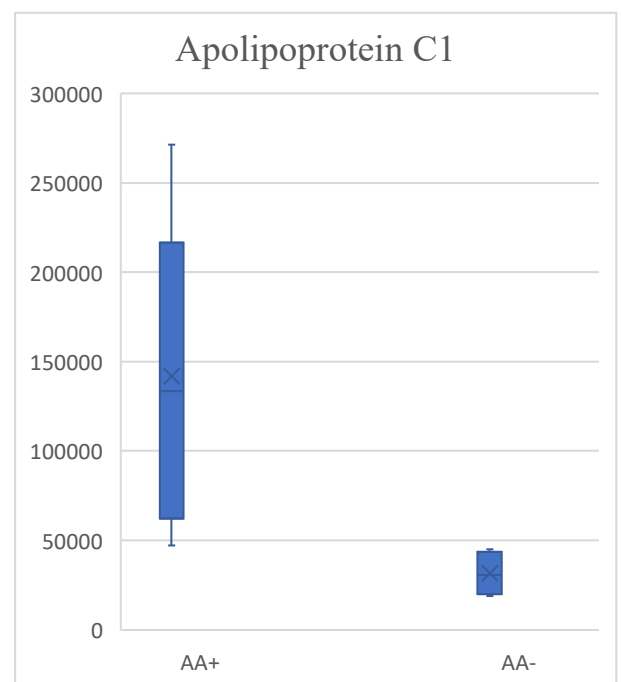


Figura 3.10: Livelli di Apolipoproteina C1 in gatti AA+ e AA-

4. DISCUSSIONE

4.1 ANALISI DELLE PROTEINE RILEVATE

4.1.1 ALPHA-2-ANTIPLASMIN

L'alfa-2-antiplasmina è l'inibitore più importante della fibrinolisi. È un inibitore della serin-proteasi ed appartiene alla famiglia delle serpine (Lee et al. 2004).

Nella matrice extracellulare vi è un lento ma continuo turnover dovuto a degradazione e nuova sintesi, in ciascuno di questi casi i componenti della matrice vengono degradati da enzimi proteolitici extracellulari che sono secreti localmente dalle cellule (Lu et al. 2011).

Ci sono 2 principali classi di proteasi:

- Metallo-proteasi: dipendono da un metallo legato, come lo Zn, per la loro attività
- Serin-proteasi: hanno un residuo di serina altamente reattivo nel loro sito attivo.

Diversi meccanismi si adoperano per assicurare che la degradazione delle componenti della matrice sia strettamente controllata (Lu et al. 2011).

L'azione delle proteasi è confinata ad aree specifiche mediante diversi inibitori delle proteasi come gli inibitori tissutali delle metallo-proteasi e gli inibitori delle serin-proteasi, noti come serpine. Questi inibitori (Figura 4.1) sono specifici per le diverse proteasi e si legano strettamente all'enzima attivato per bloccarne l'attività.

Serine Protease	Serpin
Chymotrypsin	alpha-1-antichymotrypsin
Complement factor C1s	C1 Inhibitor (C1INH)
Elastase (secreted by neutrophils)	alpha-1-antitrypsin
Clotting factor 10 (X)	antithrombin III
Thrombin	antithrombin III
Plasmin	alpha-2-antiplasmin
Trypsin	pancreatic trypsin inhibitor

Figura 4.1: Principali Serin-proteasi presenti nell'organismo con relative Serpine

Gli inibitori possono essere secreti dalle cellule ai confini delle aree di attiva degradazione per proteggere la matrice non coinvolta nel processo.

La fibrinolisi si innesca quando il prodotto della coagulazione, la trombina, scinde i fibrinopeptidi A e B dal fibrinogeno, portando alla formazione di una rete di fibrina. Successivamente la trombina attiva il fattore XIII che lega la fibrina. L'attivatore del plasminogeno tissutale o l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi convertono infine il plasminogeno in plasmina. La plasmina scinde la fibrina in prodotti di degradazione della fibrina. Gli inibitori diretti della plasmina sono l'alfa2-antiplasmina, l'alfa2-macroglobulina e l'inibitore della C-1 esterasi. La formazione di plasmina può essere ridotta da altri inibitori tra cui l'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (Miszta et al., 2021).

L' α 2-antiplasmina fisiologicamente circola nel plasma a una concentrazione elevata ed è anche un costituente degli α -granuli piastrinici, per cui la plasmina presente nel sangue o in prossimità di un trombo ricco di piastrine viene di solito rapidamente neutralizzata dall' α 2-antiplasmina (Erez et al., 2009).

4.1.2 INHIBITOR OF CARBONIC ANHYDRASE-LIKE

L'anidrasi carbonica è una metalloproteina che catalizza la rapida conversione reversibile di anidride carbonica e acqua in acido carbonico, protoni e ioni bicarbonato.

Questa reazione è fondamentale nella regolazione dell'equilibrio acido-base negli organismi essendo coinvolta in molti processi fisiologici, come la gluconeogenesi e l'urogenesi, e contribuendo alla rimozione di anidride carbonica dai tessuti; la reazione è lenta in condizioni fisiologiche ma diventa molto veloce in presenza dell'enzima (Tripp et al., 2001).

Le anidrasi carboniche sono quindi coinvolte in processi fisiologici connessi alla respirazione e al trasporto di anidride carbonica e bicarbonato attraverso i tessuti di metabolizzazione e i polmoni. Esse, inoltre, regolano il pH, la secrezione di elettroliti, il riassorbimento osseo e la calcificazione (Lomelino, Supuran, and McKenna 2016).

Le anidrasi carboniche sono divise in 6 classi differenti:

- α : presente nei vertebrati, nei batteri, nelle alghe e nel citoplasma delle piante verdi
- β : presente nei batteri e nelle alghe
- γ : presente in archeobatteri e altri tipi di batteri
- δ : presente in diatomee marine
- ζ : presente in diatomee marine
- η : presente nei protozoi

Nei vertebrati più sviluppati, compresi gli esseri umani, sono stati scoperti quattordici differenti isoenzimi delle α -CA, numerati da I a XIV. Gli isoenzimi delle anidrase carboniche si distinguono in base alla diversa distribuzione tissutale e subcellulare o in base alla modulazione dell'attività catalitica (idratazione dell'anidride carbonica), dovuta alle differenze strutturali presenti nel loro sito attivo (Tarchi, 2014).

Il cofattore zinco, presente nel sito attivo, è coordinato con tre istidine e una molecola d'acqua a formare un complesso tetraedrico. A pH fisiologico il quarto ligando dello zinco è un idrossile (Lomelino et al., 2016).

Sono note due principali classi di inibitori dell'anidrase carbonica:

- Gli anioni complessanti il metallo
- Le sulfonamidi non sostituite.

L'anidrase carbonica è classicamente inibita da composti con un gruppo legante lo zinco a base di sulfonamidi o dai loro bioisosteri solfammati e sulfammidi. Le sulfonamidi si legano in una geometria tetraedrica, interagendo direttamente con lo zinco catalitico e inibiscono l'attività delle anidrase carboniche spostando lo ione acqua/idrossido legato allo zinco (Lomelino et al., 2016).

4.1.3 ALPHA-ENOLASE

L' α -enolasi (ENO1) è un enzima glicolitico chiave presente nel citoplasma delle cellule procariotiche ed eucariotiche ed espresso in modo ubiquitario nei tessuti compresi fegato, cervello, reni e milza. È un metalloenzima che richiede lo ione magnesio per essere cataliticamente attivo (Díaz-Ramos et al., 2012). Nei vertebrati l'enzima si presenta sotto forma di tre isoforme: l' α -enolasi (Eno1) che si trova in quasi tutti i tessuti, la β -enolasi (Eno3) che si trova prevalentemente nei tessuti muscolari e la γ -enolasi (Eno2) che si trova solo nei tessuti neuronali e neuroendocrini.

Ogni isoenzima è un omodimero composto da 2 subunità α , 2 γ o 2 β e funziona come un enzima glicolitico coinvolto nella sintesi del piruvato: l'enolasi catalizza la conversione del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato nelle ultime fasi della via glicolitica catabolica (Figura 4.3) (Díaz-Ramos et al., 2012).

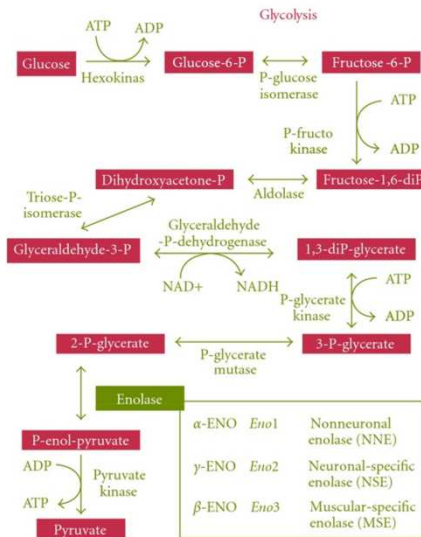


Figura 4.3: Schema riassuntivo della glicolisi

All'interno delle cellule, l'enolasi si localizza prevalentemente nel citoplasma, sebbene sia stata descritta nell'uomo anche una forma localizzata nel nucleo. La sua forma nucleare, nota anche come MBP1, funziona esclusivamente come soppressore tumorale legando e inibendo il protooncogene ma manca dell'attività enzimatica glicolitica della forma citoplasmatica (Novelli, 2017).

L' α -enolasi è considerata una proteina multifunzionale, viene espressa sulla superficie di diversi tipi di cellule ed agisce come recettore del plasminogeno sulla superficie di cellule ematopoietiche come monociti, linfociti T e linfociti B, e di cellule epiteliali ed endoteliali, svolgendo un ruolo importante nel sistema fibrinolitico intravascolare e pericellulare. È inoltre un mediatore nell'attivazione della plasmina e nella degradazione della matrice extracellulare. È infine una proteina dello stress ossidativo nelle cellule endoteliali, una proteina da shock termico ed è coinvolta nel legame delle strutture del citoscheletro e della cromatina nella trascrizione (Novelli, 2017).

4.1.4 FIBULIN-1

Le fibuline sono una famiglia di glicoproteine della matrice extracellulare caratterizzate da un dominio C-terminale di tipo fibulinico. Il dominio terminale I della fibulina è costituito da tre moduli di anafilatossine, ciascuno lungo circa 40 residui e contenente quattro o sei cisteine (Kobayashi et al., 2007).

Esistono complessivamente cinque fibuline che possono essere classificate in due sottogruppi: la fibulina 1 insieme alla fibulina 2 costituiscono un unico sottogruppo.

Sia la fibulina 1 che la fibulina 2 sono localizzate nelle membrane basali, nelle fibre elastiche e in altre strutture del tessuto connettivo (Piscaglia et al., 2009).

La fibulina-1 è una glicoproteina che presenta una struttura allungata e molti siti di legame per il calcio. Nei vertebrati si trova nel sangue, dove si lega al fibrinogeno e si incorpora nei coaguli, e nelle matrici extracellulari dove si associa alle membrane basali e alle fibre elastiche.

È una componente importante della parete dei vasi sanguigni ed è un ligando per un gruppo eterogeneo di proteine extracellulari tra cui la fibronectina, i proteoglicani, le laminine e la tropoelastina (Kobayashi et al., 2007).

4.1.5 COMPLEMENT C3-LIKE

Il sistema del complemento è un importante componente del sistema immunitario coinvolto nella risposta infiammatoria. È formato da circa 30 proteine considerando quelle circolanti nel sangue e quelle presenti nelle membrane cellulari, che sono normalmente in forma inattiva (Sarma and Ward 2011).

Inizialmente si pensava che il complemento svolgesse un ruolo importante nell'immunità innata dove viene messa in atto una risposta rapida ed efficace contro gli agenti patogeni. Tuttavia, sta diventando sempre più evidente il fatto che il complemento svolga un ruolo importante anche nell'immunità adattativa, coinvolgendo le cellule T e B che contribuiscono all'eliminazione degli agenti patogeni e al mantenimento della memoria immunologica, impedendo la re-invasione dei patogeni. Non solo il complemento è coinvolto nell'immunità innata e adattativa, ma anche nella rigenerazione dei tessuti, nella crescita dei tumori e negli stati patologici umani (Sarma & Ward, 2011).

Le vie di attivazione del complemento sono principalmente 3 (Figura 4.4) (Delves, 2021):

- via classica: innescata dalla reazione tra l'anticorpo e l'agente estraneo all'organismo.
- via alternativa: è indipendente dagli anticorpi e può essere innescata direttamente dall'agente estraneo.

- via della lectina: è anticorpo-indipendente e si innesca nel momento in cui la lectina, proteina chiave nel riconoscimento dei polisaccaridi presenti sulle membrane cellulari, si lega al mannosio, al fruttosio o ai gruppi N-acetilglucosaminici che si trovano sulla membrana cellulare di batteri, virus o lieviti.

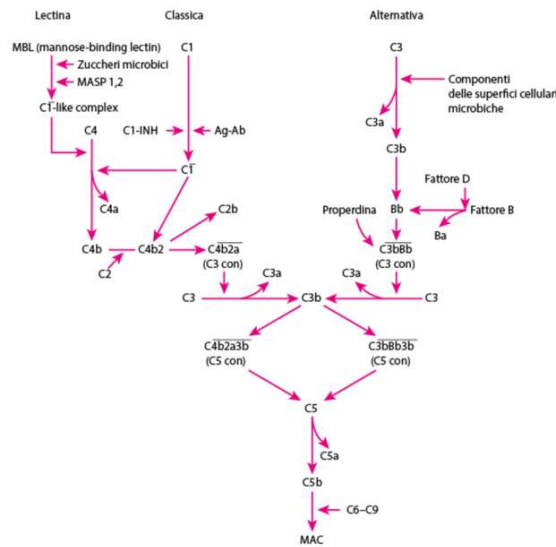


Figura 4.4: Schema delle 3 vie di attivazione del complemento

In tutti e tre i casi il risultato finale è la formazione del MAC (complesso di attacco della membrana). Per prima cosa il MAC si lega all'agente estraneo causando la distruzione della cellula per lisi, successivamente, grazie ad una maggiore permeabilità dei vasi sanguigni, i leucociti escono dal torrente circolatorio e arrivano nei tessuti coinvolti dalla reazione. Viene stimolata anche la fagocitosi attraverso cui i neutrofili e i macrofagi eliminano i microrganismi fagocitandoli (Delves, 2021).

Il C3 è un componente centrale nell'attivazione del complemento, nella difesa immunitaria e nella regolazione immunitaria; in tutte le vie di attivazione del complemento, infatti, il passaggio fondamentale è il clivaggio della proteina C3 in C3b e C3a.

Il C3 e i peptidi da esso derivati partecipano alle reazioni infiammatorie, sono immunoregolatori e sono responsabili dell'eliminazione dell'agente patogeno e dell'opsonizzazione (Wu et al., 2022).

Gli epatociti sono il principale sito di sintesi del C3 mentre la sintesi extraepatica avviene principalmente nei macrofagi e nei monociti. La sintesi extraepatica può avvenire, in misura

minore, anche nei fibroblasti, nelle cellule epiteliali intestinali, nelle cellule della milza e in altri tipi di cellule del sistema linfoide e reticoloendoteliale (Fey George et al., n.d.).

Il gene C3 è soggetto a diversi livelli di controllo. In primo luogo c'è una restrizione nella sua espressione e produzione solo in alcuni tessuti, inoltre, gli ormoni e anche i segnali infiammatori (anche in caso di infiammazione acuta) controllano le quantità di C3 circolanti nel sangue e i suoi tassi di sintesi nei tessuti produttori (Fey George et al., n.d.).

Diversi componenti del complemento sono reagenti di fase acuta, le loro concentrazioni sieriche aumentano durante gravi infiammazioni acute e croniche e dopo danni tissutali importanti. È stato riportato che le concentrazioni di C3 aumentano lentamente entro 2-10 giorni dal danno.

Non è noto se l'aumento delle concentrazioni sieriche derivi da un tasso di sintesi più rapido nelle cellule che sintetizzavano C3 prima dell'inizio dell'infiammazione o se altri epatociti ed eventualmente altri tipi di cellule produttrici vengano reclutati per la sintesi. La maggior parte delle proteine plasmatiche della fase acuta sono prodotte dal fegato, quindi probabilmente la maggior parte del C3 di nuova sintesi che compare nel siero durante la risposta alla fase acuta viene prodotto anch'esso dal fegato.

I prodotti di fase acuta di origine epatocitaria possono essere indotti dall'interleuchina 1 e da altri agenti come glucocorticoidi, ormoni steroidei sintetici, tiroxina, insulina e frammenti di degradazione del fibrinogeno ma non è stato identificato e caratterizzato un singolo induttore infiammatorio principale di C3 (Fey George et al., n.d.).

4.1.6 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-BINDING PROTEIN COMPLEX ACID LABILE SUBUNIT

I fattori di crescita insulino-simili (IGF) sono ormoni centrali nel metabolismo in quanto sono coinvolti nell'assorbimento del glucosio, nella lipogenesi, nell'immagazzinamento del glicogeno e nella soppressione della degradazione delle proteine (LeRoith et al., 2021).

IGF-I e IGF-II sono peptidi a catena singola con rispettivamente circa il 70% e il 50% di omologia con la pro-insulina. L'IGF-I è sintetizzato dal fegato e anche da altri organi tra cui reni e polmoni. La sintesi epatica, che determina in larga misura i livelli sierici, è regolata dall'ormone della crescita (GH) e varia anche in base alla funzione epatica e allo stato nutrizionale.

L'IGF-I ha effetti anabolici acuti insulino-simili sul tessuto adiposo, sul muscolo e sul fegato. Tuttavia, il suo ruolo fisiologico più importante è quello di regolatore primario della crescita soprattutto dei tessuti mesenchimali, tra cui l'osso e la cartilagine.

L'IGF-II ha effetti metabolici e mitogenici a livello sperimentale ma la sua funzione fisiologica non è chiara anche se è stata documentata l'importanza di IGF-II per la crescita fetale. Le sue concentrazioni sieriche sono meno dipendenti dal GH rispetto a IGF-I (Macaulay, 1992).

Le proteine leganti il fattore di crescita insulino-simile (IGFBP) sono una famiglia di proteine omologhe presenti nel siero caratterizzate dalla presenza di cisteina nella loro struttura. Quasi tutti gli IGF presenti nell'ambiente extracellulare, sia nei tessuti che nella circolazione, si trovano associati alle IGFBP. Nei vertebrati esistono sette tipi distinti di IGFBP, denominate da IGFBP-1 a IGFBP-7 (Duan & Allard, 2020).

Nell'uomo è stato visto che la "acid labile subunit" (ALS) è una glicoproteina di 85 kDa prodotta quasi esclusivamente dal fegato e secreta in circolo.

La proteina ALS matura appartiene alla famiglia di proteine caratterizzate dalla presenza di leucina: sono proteine che partecipano nelle interazioni tra proteine. Le regioni N e C-terminali contengono brevi segmenti caratterizzati dalla presenza di cisteina. La superficie della proteina contiene residui carichi negativamente distribuiti in modo relativamente uniforme nelle regioni esterne del dominio, con ampie regioni di superfici elettronegative. Questo, insieme ai carboidrati N-linked caricati negativamente sulla proteina ALS, potrebbe fornire il potenziale elettrostatico necessario per interagire con il complesso binario IGF-IGFBP (insuline-like growth factor – insuline like growth factor-binding protein). La funzione consolidata dell'ALS è quella di prolungare l'emivita dei complessi binari IGF-IGFBP, l'ALS non ha alcuna affinità per l'IGF-I libero, l'IGF-II o le IGFBP non complessate. Ci sono poche prove di altre funzioni biologiche dell'ALS, anche se nei roditori, l'ablazione genetica mirata del gene corrispondente (IGFALS) sembra aumentare la sensibilità all'insulina. È stato osservato che alcuni dei soggetti gravemente carenti di IGFALS presentavano fenotipi suggestivi di un anomalo metabolismo dei carboidrati (Domené et al., 2009).

4.1.3 ANGIOTENSINOGEN

L'angiotensinogeno è una glicoproteina prodotta principalmente dal fegato e appartenente alla classe delle α -2 globuline. È un precursore macromolecolare dell'angiotensina che regola la pressione sanguigna e l'equilibrio elettrolitico.

L'angiotensinogeno viene scisso dalla renina, una proteasi aspartica, per dare inizio alla cascata di trasformazione dell'angiotensina. Con l'azione dell'enzima renina, viene prodotta l'angiotensina I e grazie all'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE) espresso dai capillari polmonari, viene prodotta l'angiotensina II (Yamashita et al., 2016).

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è uno dei principali regolatori della pressione arteriosa sistemica e dell'equilibrio dei fluidi e degli elettroliti. Il suo principale peptide effettore è l'angiotensina II che promuove il riassorbimento di sodio a livello renale e gastrointestinale, la secrezione di aldosterone e la contrazione della muscolatura liscia vascolare. Queste azioni si realizzano prevalentemente attraverso l'interazione con il recettore di tipo 1 dell'Angiotensina II.

L'interazione dell'angiotensina II con il recettore di tipo 1 induce anche l'espressione e la trascrizione di fattori di crescita e di citochine proliferative, compreso il fattore di crescita trasformante- β 1, e induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno nefrotossiche, che portano all'infiammazione, alla formazione di fibroblasti e alla deposizione di collagene (H. Lu et al., 2016).

4.1.8 IG λ VARIABLE

Le immunoglobuline sono delle glicoproteine composte da 4 catene polipeptidiche: due catene peptidiche pesanti identiche di peso molecolare di 50 kD unite a due catene leggere uguali di peso molecolare 25kD. Esistono cinque tipi diversi di catene pesanti che determinano la classe dell'immunoglobulina: le IgG presentano la catena pesante γ , le IgA sono caratterizzate dalla catena pesante α , le IgM presentano la catena pesante μ , le IgE la catena pesante ϵ e le IgD la catena pesante δ . Le catene leggere, invece, sono solo di due tipi: catene leggere κ (kappa) e λ (lambda). Le catene sono tenute unite da forza non covalenti e da ponti S-S (Figura 4.5) (Poli, 2017).

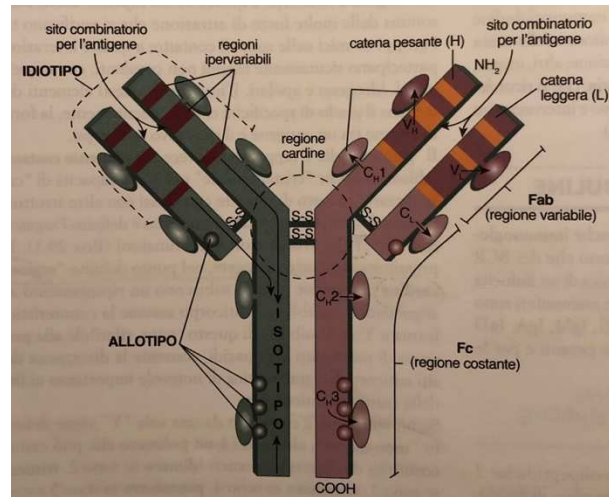


Figura 4.5: Rappresentazione della struttura delle immunoglobuline

La capacità di riconoscere e legare l'antigene è dovuta alla parte terminale, regione variabile, sia delle catene pesanti che di quelle leggere. All'estremità infatti si trova il sito combinatorio che è il punto di legame per l'epitopo antigenico verso cui l'anticorpo è specifico.

Fisiologicamente una piccola quantità di catene leggere, in eccesso rispetto alle pesanti, viene prodotta dai linfociti del sistema immunitario: queste catene non si combinano a formare delle immunoglobuline complete ma vengono rilasciate nel sangue e attraverso i reni sono eliminate in piccola quantità con le urine (Poli, 2017).

4.1.9 APOLIPOPROTEIN C-1

Le lipoproteine plasmatiche sono macromolecole idrosolubili costituite da complessi di lipidi (trigliceridi, colesterolo e fosfolipidi) e una o più proteine specifiche denominate apolipoproteine. Le lipoproteine sono raggruppate in varie classi in base alla densità in cui galleggiano in ultracentrifugazione, in base alle dimensioni delle particelle, alla mobilità elettroforetica o alla cromatografia di affinità. Le lipoproteine vengono quindi classificate in: chilomicroni, VLDL, IDL, LDL, Lp(a) e HDL. Le classi specifiche hanno funzioni metaboliche uniche (Luo et al., 1989).

Le apolipoproteine sono quindi degli agenti fisiologici per il trasporto nei fluidi acquosi dei lipidi idrofobici. Oltre al ruolo strutturale nella formazione delle lipoproteine, le apolipoproteine partecipano attivamente all'elaborazione metabolica dei lipidi endogeni ed esogeni, fungendo da ligandi per i recettori della membrana cellulare e modulando l'attività di enzimi, trasportatori e proteine di trasferimento dei lipidi.

Alcune apolipoproteine sono confinate a determinati tipi di lipoproteine, mentre altre, quelle scambiabili, sono in grado di trasferirsi tra le varie classi di lipoproteine (Fuior & Gafencu, 2019).

Le apolipoproteine C sono rappresentate da tre apolipoproteine a basso peso molecolare, l'apolipoproteina C1 è la più piccola di tutte le apolipoproteine C e partecipa al trasporto e al metabolismo dei lipidi.

Il fegato è il loro principale sito di sintesi mentre l'intestino contribuisce alla loro sintesi in misura minore (Mahley et al., 1984).

4.2 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELL'ANALISI PROTEOMICA

Considerando il gruppo di 10 gatti analizzati, di cui 6 positivi ad amiloidosi e 4 negativi, dall'analisi proteomica è risultato che le proteine meno espresse nei gatti con amiloidosi rispetto ai gatti sani sono:

- α -2-antiplasmin
- inhibitor of carbonic anhydrase-like
- fibulin-1
- angiotensinogen
- Ig lambda variable

Si è cercato di capire se queste proteine potessero essere down-regolate in stati infiammatori o in caso di malattie da accumulo essendo l'amiloidosi AA una malattia da accumulo ed essendo legata a stati infiammatori che si protraggono per lungo tempo. Se si verificasse una loro minor espressione nelle situazioni appena descritte si potrebbe pensare ad una possibile correlazione tra queste proteine e la presenza di malattia. Gli organi principalmente analizzati sono fegato, milza e rene visto che i gatti presentavano depositi di amiloide in particolare in questi organi.

α 2-antiplasmina

Uno studio eseguito su cani affetti da pancreatite acuta ha riportato che l' α 2-antiplasmina non è una proteina infiammatoria importante nel discriminare animali sani da animali malati, in quanto, in condizioni di infiammazione acuta, non tende ad aumentare rispetto ai livelli fisiologici (Kuzi et al., 2020).

Inoltre, l' α 2 antiplasmina è un inibitore della plasmina (Lee et al. 2004), se l' α 2-antiplasmina fosse meno espressa, la plasmina sarebbe meno inibita con conseguente aumento della sua funzionalità. Si è visto (Miszta et al. 2021) che la plasmina ha la funzione di degradare le proteine plasmatiche ed è la principale proteina fibrinolitica, per cui, nei gatti con amiloidosi dove vi è una sotto-espressione di α 2-antiplasmina, ci sarà una maggior azione fibrinolitica rispetto ai gatti sani, con una maggiore degradazione di proteine plasmatiche.

In conclusione, si è osservato che l' α 2-antiplasmina non è correlata a stati infiammatori e che una sua inibizione dovrebbe sfavorire l'accumulo di proteine plasmatiche vista la funzionalità proteolitica e fibrinolitica della plasmina. Non si dovrebbe quindi ritenere una sotto-espressione dell' α 2-antiplasmina un possibile marker di stati infiammatori o di malattia da accumulo.

Inibitore dell'anidrasi carbonica

L'anidrasi carbonica è coinvolta in processi fisiologici connessi alla respirazione e al trasporto di anidride carbonica e bicarbonato attraverso i tessuti di metabolizzazione e i polmoni (Tripp et al. 2001). Una minor espressione di inibitore dell'anidrasi carbonica comporta un aumento dell'espressione dell'anidrasi carbonica stessa.

Uno studio (Okada and Ikemoto 2022) riporta che l'anidrasi carbonica, in soggetti affetti da infiammazione ulcerativa della mucosa del colon, sopprime significativamente la secrezione di citochine infiammatorie e protegge dall'aggravamento della malattia.

Un altro studio (Hains et al. 2014) descrive che i topi che presentano carenza di anidrasi carbonica sono soggetti ad acidosi metabolica e ipokaliemia, hanno inoltre una produzione di urina relativamente alcalina con conseguente aumento delle infezioni del tratto urinario.

Sulla base di questi studi si può ritenere che una sotto-espressione dell'inibitore di anidrasi carbonica dovrebbe favorire l'effetto antiinfiammatorio svolto dall'anidrasi carbonica stessa,

quindi la sotto-regolazione dell'inibitore di anidraasi carbonica non è probabilmente correlabile agli stati infiammatori presenti in corso di amiloidosi.

Fibulina-1

La fibulina-1 è una proteina legante il calcio coinvolta nella mediazione delle connessioni citoplasmatiche delle integrine B1. Le integrine sono una famiglia di recettori transmembrana che mediano l'adesione alla matrice extracellulare (ECM) e alle molecole della superficie cellulare. Ogni integrina è composta da una subunità α e una β . Il legame delle integrine ai ligandi della ECM provoca la riorganizzazione del citoscheletro e favorisce la formazione di contatti focali (Wennerberg et al. 1996).

In coltura la fibulina-1 è glicosilata e secreta dai fibroblasti e viene incorporata nella matrice extracellulare in modo simile a quanto avviene con la fibronectina (Argraves et al., n.d.): la fibronectina viene legata dalle integrine alla superficie cellulare, le integrine ne inducono poi il cambiamento conformazionale necessario per la sua polimerizzazione. È stato dimostrato che la transizione della fibronectina dalla forma ripiegata ad uno stato più esteso determina l'esposizione di un sito di legame della fibronectina ("sito di autoassemblaggio") e la polimerizzazione spontanea in vitro (Wennerberg et al., 1996).

Uno studio riporta che la fibulina-1 è una glicoproteina che viene incorporata in una matrice extracellulare fibrosa quando viene espressa da cellule coltivate o aggiunta esogenamente a monostrati cellulari (Argraves et al., n.d.).

Un altro studio (Piscaglia et al. 2009), riguardo l'espressione della fibulina-1 in corso di danno epatico acuto e cronico nell'uomo e nei topi, riporta che la fibulina-1 è una componente principale dei setti fibrotici e che la sua espressione genica aumenta in presenza di fibrosi epatica.

Ci si aspetterebbe che nei processi infiammatori, in particolare nei processi infiammatori cronici dove si ha come conseguenza lo sviluppo di fibrosi, ci sia un aumento dell'espressione di fibulina-1. Nei gatti positivi analizzati, invece, la fibulina-1 è meno espressa rispetto ai gatti negativi. Non si ritiene quindi la minor espressione di fibulina-1 un'indice di infiammazione per cui probabilmente non si potrà considerare un possibile biomarker di amiloidosi AA.

Angiotensinogeno

L'angiotensinogeno, attraverso l'attivazione dell'angiotensina 2, induce l'espressione e la trascrizione di fattori di crescita e di citochine proliferative e induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno nefrotossiche che portano all'infiammazione, alla formazione di fibroblasti e alla deposizione di collagene (H. Lu et al., 2016).

Uno studio (Sparks et al. 2014) ha dimostrato che topi completamente carenti di angiotensinogeno hanno un fenotipo caratterizzato da aumento della mortalità perinatale, profonda ipotensione e anomalie del rene tra cui idronefrosi, lesioni ipertrofiche delle arterie e delle arteriole renali e ridotta capacità di concentrare l'urina, tutti fattori che possono aumentare la predisposizione all'infiammazione. Nei gatti analizzati nel nostro studio non abbiamo una completa carenza di angiotensinogeno ma è stata rilevata solamente una sua minore espressione nei gatti amiloidosi positivi. Non ci sono studi che correlano una down-regulation dell'angiotensinogeno con l'aumento di stati infiammatori quindi non si ritiene che una sua minore espressione possa essere legata allo sviluppo di amiloidosi.

Ig λ

Le catene leggere delle immunoglobuline sono prodotte dai linfociti del sistema immunitario. Si è visto (Barlough, Jacobson, and Scott 1981) che nel siero e/o nelle urine di gatti affetti da mieloma multiplo, macroglobulinemia, linfoma maligno e alcune altre patologie linforeticolari queste proteine sono prodotte in quantità eccessive da cloni di cellule maligne. Le analisi morfologiche e funzionali hanno dimostrato che le Ig patologiche sono strettamente correlate alle Ig normali; in alcuni casi, però, possono contenere delle anomalie strutturali come delezioni e/o inserzioni di aminoacidi o assenza di regioni complete della molecola Ig, come la catena leggera e la catena pesante. Anche le catene leggere delle Igs feline sono state parzialmente caratterizzate. La maggior parte delle catene leggere feline sono state identificate come catene λ sulla base della cross-reattività immunologica e della composizione amminoacidica (Barlough et al., 1981).

Una up-regolazione delle Ig λ è stata quindi associata alla presenza di mieloma multiplo, macroglobulinemia e linfoma maligno (Barlough et al. 1981) e un accumulo di Ig-lambda è osservato nella patogenesi dell'amiloidosi AL (Gertz, 2020).

In conclusione si è visto che lo sviluppo di determinate neoplasie e di amiloidosi AL è legato a una maggior espressione di Ig λ ma non ci sono studi che dimostrano invece che anche una

ridotta espressione di Ig λ possa determinare lo sviluppo di neoplasia, la formazione di fibrille amiloidi o quadri infiammatori sistemici.

Dall'analisi proteomica eseguita è risultato, invece, che le proteine più espresse nei gatti con amiloidosi sono:

- α -enolase
- complement C3
- insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
- apolipoprotein C-1

Si è cercato di capire, anche in questo caso, se una maggior espressione di queste proteine potesse essere correlata a stati infiammatori acuti o cronici, visto il legame con lo sviluppo di amiloidosi AA, e a patologie da accumulo. Gli organi principalmente analizzati sono fegato, milza e rene considerato che i gatti con amiloidosi presentavano depositi di fibrille in questi organi.

α -enolasi

L' α -enolasi (chiamata anche ENO1) svolge un ruolo importante nel sistema fibrinolitico intravascolare e pericellulare, è un mediatore nell'attivazione della plasmina e nella degradazione della matrice extracellulare ed è una proteina dello stress ossidativo nelle cellule endoteliali (Novelli 2017).

Numerosi studi (Ji et al. 2016) hanno dimostrato che ENO1 svolge un ruolo importante nello sviluppo delle risposte allo stress. Gli studi di proteomica sui meccanismi alla base dello sviluppo delle risposte cellulari allo stress hanno dimostrato che ENO1 è una delle proteine espresse in modo differenziato prima e dopo l'esposizione allo stress. I dati hanno dimostrato che le cellule esprimono spesso proteine specifiche (come le proteine da shock termico) e proteine regolate dal glucosio (tra cui ENO1) per adattarsi alle alte temperature e alla privazione di glucosio. Inoltre, i cambiamenti nei livelli di espressione delle proteine sono dipendenti dal tempo e dalla concentrazione di ossigeno. Si ipotizza che ENO1 promuova il metabolismo anaerobico in caso di stress ipossico, esercitando così un effetto protettivo sulle cellule.

La sovra-espressione dell' α -enolasi è stata osservata anche in molte cellule tumorali. Studi proteomici comparativi di alcune cellule tumorali e di tessuti normali hanno dimostrato che esistono differenze significative nei livelli di espressione di ENO1. I risultati suggeriscono che la sovra-regolazione dei livelli di espressione di ENO1 e di altri enzimi glicolitici può essere correlata alla glicolisi aerobica nelle cellule tumorali e allo sviluppo di tumori maligni (Ji et al., 2016).

È stato riportato in letteratura che l'aumento dell'espressione dell' α -enolasi è correlato alla progressione dei tumori, per cui l' α -enolasi è stata considerata un potenziale marcatore diagnostico per molti tumori (Díaz-Ramos et al., 2012).

Considerando che spesso i tumori sono caratterizzati dalla presenza di forme infiammatorie concomitanti e considerando che queste forme infiammatorie e le neoplasie stesse sono state descritte come cause predisponenti all'accumulo di fibrille amiloidi (Sack 2018), si potrebbe ritenere che una maggior espressione di α -enolasi in gatti con amiloidosi possa essere correlato alla presenza di amiloide in questi soggetti.

È stato dimostrato inoltre che ENO1 stimola la produzione di fattori infiammatori come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), l'interleuchina-1 alfa/beta (IL-1 α/β) e l'interferone gamma (IFN- γ) in soggetti con artrite reumatoide, con conseguente aumento delle concentrazioni sieriche di fattori infiammatori (Ji et al. 2016).

Infine, uno studio (López-Alemaný et al. 2003) ha dimostrato che gli anticorpi anti-ENO1 riducono l'attivazione della protrombina mediata dalla superficie cellulare diminuendo così la dissoluzione della fibrina. Le concentrazioni di fibrinogeno e fibrina di conseguenza aumentano, favorendo la produzione di fattori proinfiammatori e chemochine e inducendo risposte infiammatorie.

In letteratura è quindi descritto il coinvolgimento di α -enolasi in stati infiammatori e tumorali, per cui, una sua maggior espressione in gatti AA+, potrebbe essere correlata alla presenza di malattia.

Apolipoproteina C1

Nell'uomo è stato visto (H.-J. Wang et al. 2021) che l'apolipoproteina C1, membro della famiglia delle apolipoproteine C, è coinvolta nel metabolismo delle lipoproteine modulando l'attività degli enzimi legati al metabolismo delle lipoproteine intravascolari. È stato anche

riportato (H.-J. Wang et al. 2021) che APOC1 è correlata all'insorgenza e alla prognosi della maggior parte dei tumori come ad esempio il cancro alla prostata, il cancro al colon e il cancro allo stomaco.

Inoltre, l'espressione di APOC1 è aumentata gradualmente nei pazienti affetti da cancro al polmone dagli stadi iniziali a quelli tardivi ed è up-regolata nei tessuti glomerulari dei pazienti con nefropatia diabetica influenzandone la sclerosi glomerulare e la disfunzione renale (H.-J. Wang et al., 2021). Tutto questo indica il coinvolgimento di APOC1 nella regolazione dei processi tumorali e nella nefropatia diabetica.

I gatti analizzati presentavano accumulo di fibrille amiloidi nel rene quindi si potrebbe ritenere possibile un'associazione tra l'insulto renale causato dalle fibrille amiloidi e la sovra-regolazione dell'apolipoproteina C1 anche se ulteriori approfondimenti andrebbero effettuati.

Complemento C3

È stato osservato che diversi componenti della cascata del complemento sono reagenti di fase acuta e che le loro concentrazioni sieriche aumentano durante gravi infiammazioni acute e croniche e dopo danni tissutali importanti (Fey George et al., n.d.). Inoltre è riportato in letteratura che una delle principali sedi di sintesi extrabiliare del fattore C3 sono i macrofagi (Fey George et al. n.d.).

La fibrosi interstiziale renale (RIF) è una concausa di insufficienza renale in fase terminale ed è causata da insulti renali che si protraggono per lungo tempo. La gravità della fibrosi viene solitamente associata alla prognosi. I macrofagi sono considerati importanti responsabili della RIF, si è osservato infatti che l'accumulo di macrofagi è strettamente correlato alla gravità del danno interstiziale e alla disfunzione renale (Cui et al., 2019).

In risposta a stimoli ambientali, i macrofagi si organizzano in diverse popolazioni con funzioni distinte. Possono essere macrofagi attivati in modo classico (M1) oppure macrofagi attivati in modo alternativo (M2). I macrofagi mostrano un'enorme plasticità nella loro funzione, partecipando al danno tissutale o alla sua guarigione. I macrofagi M1 sono associati all'infiammazione e alla distruzione dei tessuti e sono di conseguenza responsabili dell'inizio della fibrosi (Cui et al. 2019).

Per cui è stato riportato che in caso di infiammazioni croniche il rene è soggetto a fibrosi come risposta al danno e che in corso di fibrosi c'è un maggiore coinvolgimento dei macrofagi, sede di sintesi del fattore C3 (Cui et al., 2019).

Infine uno studio (Potter et al. 1978) riporta che in molte patologie epatiche umane, quali steatosi epatica (che può essere considerata una malattia da accumulo visto l'elevato accumulo di lipidi a livello epatico) o malattie epatiche causate dall'alcol, la trasformazione del grasso e l'infiammazione influenzano il coinvolgimento dell'attivazione del complemento. Sia essa causale o come conseguenza dell'evidenza istopatologica di danno d'organo, i livelli di C3 sono aumentati.

Concludendo si potrebbe ritenere che una sovra-espressione della proteina C3 possa essere associata alla presenza di amiloidosi se si considera il quadro infiammatorio concomitante alla patologia. È stato descritto infatti il coinvolgimento del complemento C3 in corso di fibrosi e in malattie epatiche da accumulo, come la steatosi.

Insuline like growth factor binding protein acid labile subunit

Il fegato è un organo coinvolto nell'omeostasi dell'organismo intervenendo nel metabolismo del glucosio e dei lipidi, è anche uno dei principali siti di sintesi delle proteine plasmatiche e dei fattori endocrini come IGF 1 e IGF 2, nonché delle loro binding proteins (IGFBPs) (Adamek & Kasprzak, 2018).

Le insuline-like-growth factor (IGFs) nei fluidi biologici sono associate alle binding proteins (IGFBPs) che sono i principali regolatori della bioattività delle IGF e della loro attività nelle vie di segnalazione metabolica. Inoltre, queste proteine prolungano l'emivita delle IGF nel flusso sanguigno immagazzinandole in specifici compartimenti tissutali, ne inibiscono l'attività riducendo l'accessibilità dei loro recettori e le proteggono dalla degradazione proteolitica.

Le IGFs fanno parte della fisiologia epatica regolandone lo sviluppo, la crescita e la rigenerazione. A livello cellulare, sia le IGFs (endocrine e autocrine/paracrine), sia i loro recettori regolano la progressione del ciclo cellulare, la proliferazione e la differenziazione degli epatociti. In generale, i componenti del sistema IGF sono epatoprotettivi e svolgono un ruolo molto importante negli effetti ormonali e metabolici (Adamek & Kasprzak, 2018).

È stato dimostrato (Adamek and Kasprzak 2018) che pazienti con steatosi epatica e fibrosi avanzata avevano livelli più elevati di IGFBP. I dati epidemiologici sul sistema IGF hanno mostrato che bassi livelli sierici di IGF1, insieme a livelli più alti di IGFBP sono associati a

una maggiore gravità della steatosi epatica non alcolica. È stato quindi osservato un coinvolgimento delle IGFBP in patologie infiammatorie epatiche che sviluppano fibrosi e nella steatosi. Si potrebbe ritenere una sovra-regolazione delle IGFBP un possibile marker di amiloidosi a livello epatico se si considera la presenza di infiammazione associata ad amiloidosi e considerando che anche in altre patologie da accumulo, come la steatosi, si ha una sua sovra-espressione.

Alcuni studi (S. Wang et al. 2021) hanno dimostrato che la famiglia delle IGFBP è associata allo sviluppo del rene, a malattie renali primarie e a malattie renali secondarie come la nefropatia diabetica e la malattia renale cronica (CKD). Attualmente, l'IGFBP-7 è stato utilizzato come marcatore di diagnosi precoce e prognostico per l'insufficienza renale acuta. Anche altre IGFBP sono state identificate come biomarcatori in diverse malattie renali: le IGFBP-1/3/4 sono strettamente associati al diabete e alla nefropatia diabetica, IGFBP-3/4/5/6 sono coinvolte in diversi processi fisiologici di malattie renali come diabete, glomerulosclerosi e CKD.

Sebbene gli studi attuali sul meccanismo degli IGFBP nelle malattie renali siano ancora pochi e non sistematici (S. Wang et al. 2021) si potrebbe ritenere possibile un coinvolgimento delle IGFBP anche in caso di amiloidosi renale vista la loro up-regolazione nei casi di insufficienza renale e in malattie renali croniche.

4.3 LIMITI DELLO STUDIO

Il primo limite di questo studio riguarda la scarsa numerosità dei casi, sono stati considerati solo 10 gatti in totale dei quali 6 con amiloidosi e 4 senza amiloidosi.

Questa scarsa numerosità non permette di assegnare una grande affidabilità ai risultati ottenuti anche se le considerazioni effettuate possono rappresentare un punto di partenza per studi futuri sull'utilizzo della proteomica come strumento di ricerca per approfondire l'amiloidosi felina.

Le proteine rilevate dovrebbero essere indagate in un campione più ampio per poter effettuare delle considerazioni più significative.

Un secondo limite è dato dal fatto che, nel caso venissero riscontrate delle proteine che possono fungere da biomarker di amiloidosi, l'analisi proteomica non può essere utilizzata nella pratica clinica ma dovrebbero essere sviluppati dei test specifici per la ricerca del biomarker considerato.

Infine, il limite più importante è la scarsa letteratura presente riguardo l'amiloidosi AA nel gatto, questo influisce su tutte le possibili valutazioni poiché ci sono ancora pochi studi che possono chiarire l'esatta patogenesi e sviluppo della malattia.

5. CONCLUSIONE

Sulla base dei rilievi emersi da questo studio si può ritenere che l'analisi proteomica è stata utile per rilevare la differenza di espressione proteica tra gatti AA+ e gatti AA-.

Per quanto riguarda le proteine meno espresse nei gatti AA+ non ci sono studi riguardo un possibile significato della loro sotto-espressione in soggetti con amiloidosi AA. Si è provato quindi a vedere se ci fosse un possibile nesso tra una loro minor espressione e lo sviluppo di stati infiammatori acuti e cronici o di altre patologie da accumulo. I risultati disponibili in letteratura indicano l'assenza di nesso tra le proteine meno espresse e lo sviluppo di infiammazione o patologie da accumulo, pertanto il loro ruolo come biomarker di amiloidosi è per ora dubbio, anche se andrebbero svolti ulteriori studi e approfondimenti.

Per quanto riguarda le proteine più espresse nei gatti AA+ non ci sono dati in letteratura che abbiano approfondito una loro sovra-espressione in soggetti con amiloidosi. Alcuni studi, non nel gatto ma in medicina umana, identificano un'associazione tra tali proteine (sovra-espresse) ed alcuni stati infiammatori o alcune patologie da accumulo, come la steatosi epatica.

Si può quindi ipotizzare, che tali proteine abbiano una relazione con l'amiloidosi AA, dal momento che sono sovra-espresse in condizioni infiammatorie. Le proteine rilevate potrebbero quindi rappresentare dei possibili biomarker di amiloidosi per il gatto. Si tratta tuttavia di dati preliminari che necessitano di ulteriore valutazione.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adamek, Agnieszka, and Aldona Kasprzak. 2018. "Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 19(5)
- Argraves, W. Scott, Huan Tran, Wilson H. Burgess, and Kenneth Diekerson. n.d. *Fibulin Is An Extracellular Matrix and Plasma Glycoprotein with Repeated Domain Structure*.
- Barlough, J. E., R. H. Jacobson, and F. W. Scott. 1981. "The Immunoglobulins of the Cat."
- Benson, Merrill D. 2003. "The Hereditary Amyloidoses." *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 17(6):909–27.
- Bruce, Can, Kathryn Stone, Erol Gulcicek, and Kenneth Williams. 2013. "Proteomics and the Analysis of Proteomic Data: 2013 Overview of Current Protein-Profiling Technologies." *Current Protocols in Bioinformatics* Chapter 13:Unit 13.21.
- Cui, Jiong, Xiaoting Wu, Yankun Song, Yi Chen, and Jianxin Wan. 2019. "Complement C3 Exacerbates Renal Interstitial Fibrosis by Facilitating the M1 Macrophage Phenotype in a Mouse Model of Unilateral Ureteral Obstruction." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 317(5):F1171–82.
- Delves, Peter. 2021. "Sistema Del Complemento."
- Dember, Laura M. 2006. "Amyloidosis-Associated Kidney Disease." *Journal of the American Society of Nephrology* 17(12):3458–71.
- Díaz-Ramos, Angels, Anna Roig-Borrellas, Ana García-Melero, and Roser López-Alemany. 2012. "α-Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012:156795.

- Domené, Horacio M., Vivian Hwa, Jesús Argente, Jan M. Wit, Cecilia Camacho-Hübner, Héctor G. Jasper, Jesús Pozo, Hermine A. van Duyvenvoorde, Shoshana Yakar, Olga v. Fofanova-Gambetti, and Ron G. Rosenfeld. 2009. “Human Acid-Labile Subunit Deficiency: Clinical, Endocrine and Metabolic Consequences.” *Hormone Research in Paediatrics* 72(3):129–41.
- Douglas A. Skoog, Donald West, and James Holler. 2005. *Fondamenti Di Chimica Analitica*. edited by Zanichelli. Bologna.
- Duan, Cumming, and John B. Allard. 2020. “Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-5 in Physiology and Disease.” *Frontiers in Endocrinology* 11:100.
- Erez, Elinor, Deborah Fass, and Eitan Bibi. 2009. “How Intramembrane Proteases Bury Hydrolytic Reactions in the Membrane.” *Nature* 459(7245):371–78.
- Ernst, Orna, and Tsaffir Zor. 2010. “Linearization of the Bradford Protein Assay.” *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (38).
- Ferri, Filippo, Silvia Ferro, Federico Porporato, Carolina Callegari, Maria Mazza, Marta Ferrero, Chiara Crinò, Enrico Gallo, Luigi M. Coppola, Gabriele Gerardi, Monique Vogel, Federico Storni, Martin F. Bachmann, Anne-Cathrine Vogt, Francesca Lavatelli, Lorena Vailati, Giovanni Palladini, Giampaolo Merlini, Tim Paul Schulte, Stefano Ricagno, and Policlinico San Matteo. n.d. *AA-Amyloidosis in Cats (Felis Catus) Housed in Shelters 1 2*.
- Fey George, Domdey Horst, Wiebauer Karin, Whitehead Alexander, and Odink Karel. n.d. *Springer Seminars in Immunopathology Structure and Expression of the C3 Gene*.
- Fuor, Elena v, and Anca v Gafencu. 2019. “Apolipoprotein C1: Its Pleiotropic Effects in Lipid Metabolism and Beyond.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(23).

- Gertz, Morie A. 2020. "Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis: 2020 Update on Diagnosis, Prognosis, and Treatment." *American Journal of Hematology* 95(7):848–60.
- Geyer, Philipp E., Lesca M. Holdt, Daniel Teupser, and Matthias Mann. 2017. "Revisiting Biomarker Discovery by Plasma Proteomics." *Molecular Systems Biology* 13(9):942.
- Hains, David S., Xi Chen, Vijay Saxena, Evan Barr-Beare, Weisi Flemming, Robert Easterling, Brian Becknell, George J. Schwartz, and Andrew L. Schwaderer. 2014. "Carbonic Anhydrase 2 Deficiency Leads to Increased Pyelonephritis Susceptibility." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 307(7):F869-80.
- Holmes, W. E., L. Nelles, H. R. Lijnen, and D. Collen. 1987. "Primary Structure of Human Alpha 2-Antiplasmin, a Serine Protease Inhibitor (Serpine)." *The Journal of Biological Chemistry* 262(4):1659–64.
- Ji, Hong, Jianfa Wang, Jingru Guo, Yue Li, Shuai Lian, Wenjin Guo, Huanmin Yang, Fanzhi Kong, Li Zhen, Li Guo, and Yanzhi Liu. 2016. "Progress in the Biological Function of Alpha-Enolase." *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)* 2(1):12–17.
- Kelly-Robinson, Gillian A., James A. Reihill, Fionnuala T. Lundy, Lorcan P. McGarvey, John C. Lockhart, Gary J. Litherland, Keith D. Thornbury, and S. Lorraine Martin. 2021. "The Serpin Superfamily and Their Role in the Regulation and Dysfunction of Serine Protease Activity in COPD and Other Chronic Lung Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 22(12).
- Kobayashi, Naoyuki, Günter Kostka, Jörg H.O. Garbe, Douglas R. Keene, Hans Peter Bächinger, Franz-Georg Hanisch, Dessislava Markova, Takeshi Tsuda, Rupert Timpl, Mon-Li Chu, and Takako Sasaki. 2007. "A Comparative Analysis of the Fibulin Protein Family." *Journal of Biological Chemistry* 282(16):11805–16.

- Kobayashi, Naoyuki, Günter Kostka, Jörg H O Garbe, Douglas R. Keene, Hans Peter Bächinger, Franz-Georg Hanisch, Dessislava Markova, Takeshi Tsuda, Rupert Timpl, Mon-Li Chu, and Takako Sasaki. 2007. “A Comparative Analysis of the Fibulin Protein Family. Biochemical Characterization, Binding Interactions, and Tissue Localization.” *The Journal of Biological Chemistry* 282(16):11805–16.
- Kuzi, Sharon, Michal Mazaki-Tovi, Jan S. Suchodolski, Dar Rimer, Jonathan A. Lidbury, Joerg M. Steiner, Agostino Buono, Ran Nivy, Gilad Segev, and Itamar Aroch. 2020. “Protease Inhibitors, Inflammatory Markers, and Their Association with Outcome in Dogs with Naturally Occurring Acute Pancreatitis.” *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34(5):1801–12.
- Kyle, Robert A. 2001. “Amyloidosis: A Convuluted Story.” *British Journal of Haematology* 114(3):529–38.
- Lee, Kyung N., Kenneth W. Jackson, Victoria J. Christiansen, Keun H. Chung, and Patrick A. McKee. 2004. “A Novel Plasma Proteinase Potentiates A2-Antiplasmin Inhibition of Fibrin Digestion.” *Blood* 103(10):3783–88.
- LeRoith, Derek, Jeff M. P. Holly, and Briony E. Forbes. 2021. “Insulin-like Growth Factors: Ligands, Binding Proteins, and Receptors.” *Molecular Metabolism* 52:101245.
- Lomelino, Carrie L., Claudiu T. Supuran, and Robert McKenna. 2016. “Non-Classical Inhibition of Carbonic Anhydrase.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(7).
- López-Alemaný, Roser, Colin Longstaff, Stephen Hawley, Massoud Mirshahi, Pere Fábregas, Merce Jardí, Elizabeth Merton, Lindsey A. Miles, and Jordi Félez. 2003. “Inhibition of Cell Surface Mediated Plasminogen Activation by a Monoclonal Antibody against Alpha-Enolase.” *American Journal of Hematology* 72(4):234–42.
- Lu, Hong, Lisa A. Cassis, Craig W. vander Kooi, and Alan Daugherty. 2016. “Structure and Functions of Angiotensinogen.” *Hypertension Research* 39:492–500.

- Lu, Pengfei, Ken Takai, Valerie M. Weaver, and Zena Werb. 2011. "Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(12).
- Luo, C. C., W. H. Li, and L. Chan. 1989. "Structure and Expression of Dog Apolipoprotein A-I, E, and C-I MRNAs: Implications for the Evolution and Functional Constraints of Apolipoprotein Structure." *Journal of Lipid Research* 30(11):1735–46.
- Lustig, Alessandro, and Gino Galeotti. 1923. *Trattato Di Patologia Generale*. Milano.
- Macaulay, V. M. 1992. "Insulin-like Growth Factors and Cancer." *British Journal of Cancer* 65(3):311–20.
- Mahley, R. W., T. L. Innerarity, S. C. Rall, and K. H. Weisgraber. 1984. "Plasma Lipoproteins: Apolipoprotein Structure and Function." *Journal of Lipid Research* 25(12):1277–94.
- Miszta, Adam, Dana Huskens, Demy Donkervoort, Molly J. M. Roberts, Alisa S. Wolberg, and Bas de Laat. 2021. "Assessing Plasmin Generation in Health and Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 22(5):1–17.
- Novelli, Francesco. 2017. "Alpha-Enolase i ENO1 i a Potential Target in Novel Immunotherapies." *Frontiers in Bioscience* 22(5):4526.
- Okada, Kohki, and Masaki Ikemoto. 2022. "Carbonic Anhydrase III Has Potential as a Biomarker for Experimental Colitis and Functions as an Immune Regulator by Inhibiting Inflammatory Cytokine Secretion." *Biology* 11(4).
- Picken, Maria M. 2020. "The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review." *Acta Haematologica* 143(4):322–34.
- Piscaglia, Fabio, József Dudás, Thomas Knittel, Paola di Rocco, Dominik Kobold, Bernhard Saile, Maria Assunta Zocco, Rupert Timpl, and Giuliano Ramadori. 2009.

- “Expression of ECM Proteins Fibulin-1 and -2 in Acute and Chronic Liver Disease and in Cultured Rat Liver Cells.” *Cell and Tissue Research* 337(3):449–62.
- Poli, Giorgio. 2017. *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. Milano: Edra S.p.A.
- Potter, B. J., E. Elias, P. M. Fayers, and E. A. Jones. 1978. “Profiles of Serum Complement in Patients with Hepatobiliary Diseases.” *Digestion* 18(5–6):371–83.
- Sack, George H. 2018. “Serum Amyloid A - A Review.” *Molecular Medicine* 24(1).
- Sarma, J. Vidya, and Peter A. Ward. 2011. “The Complement System.” *Cell and Tissue Research* 343(1):227–35.
- Sparks, Matthew A., Steven D. Crowley, Susan B. Gurley, Maria Mirotsoy, and Thomas M. Coffman. 2014. “Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology.” *Comprehensive Physiology* 4(3):1201–28.
- Tarchi, Erica. 2014. “Anidrasi Carbonica: Sintesi Di Derivati Tiopiranopirazolici Quali Potenziali Inibitori Isoforma-Selettivi.”
- Tripp, Brian C., Kerry Smith, and James G. Ferry. 2001. “Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme.” *Journal of Biological Chemistry* 276(52):48615–18.
- Wang, Hai-Jun, Yong-Xiang Ma, Ai-Hua Wang, Yuan-Shun Jiang, and Xian-Zhou Jiang. 2021. “Expression of Apolipoprotein C1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: An Oncogenic Gene and a Prognostic Marker.” *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 37(5):419–26.
- Wang, Shuqiang, Kun Chi, Di Wu, and Quan Hong. 2021. “Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins in Kidney Disease.” *Frontiers in Pharmacology* 12:807119.

- Wennerberg, K., L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson, and R. Fässler. 1996. "Beta 1 Integrin-Dependent and -Independent Polymerization of Fibronectin." *Journal of Cell Biology* 132(1):227–38.
- Woldemeskel, Moges. 2012. "A Concise Review of Amyloidosis in Animals." *Veterinary Medicine International* 2012:1–11.
- Wu, Meng, Bei-bei Jia, and Mo-fei Li. 2022. "Complement C3 and Activated Fragment C3a Are Involved in Complement Activation and Anti-Bacterial Immunity." *Frontiers in Immunology* 13.
- Yakupova, Elmira I., Liya G. Bobyleva, Ivan M. Vikhlyantsev, and Alexander G. Bobylev. 2019. "Congo Red and Amyloids: History and Relationship." *Bioscience Reports* 39(1).
- Yamashita, Shinji, Naoya Shibata, Akiyoshi Boku-Ikeda, Erika Abe, Ayumi Inayama, Takashi Yamaguchi, Ayano Higuma, Kaoru Inagaki, Tomoyo Tsuyuzaki, Satoshi Iwamoto, Satoshi Ohno, Takashi Yokogawa, Kazuya Nishikawa, Kazal Boron Biswas, A. H. M. Nurun Nabi, Tsutomu Nakagawa, Fumiaki Suzuki, and Akio Ebihara. 2016. "Escherichia Coli-Based Production of Recombinant Ovine Angiotensinogen and Its Characterization as a Renin Substrate." *BMC Biotechnology* 16:33.