



DAIRY ZOOM

Chimica, biochimica e fisiologia della produzione del latte

di ALESSANDRO FANTINI

Le proteine della fase acuta come biomarkers

Le proteine della fase acuta (APP) sono un gruppo di proteine plasmatiche considerate componenti del sistema immunitario innato non specifico, la cui concentrazione è influenzata da infezioni, infiammazioni, traumi, stress ed altro. Sono generalmente coinvolte nel ripristino dell'omeostasi prima che l'animale sviluppi una risposta immunitaria acquisita o ritrovi il suo equilibrio fisiologico. Nel caso dello stress, ad esempio, l'incrementata produzione di APP induce quella febbre e sonnolenza utile all'organismo in questo tipo di evento negativo. Nell'uomo, a titolo d'esempio, ne vengono prodotte, in condizioni normali, circa 20 grammi al giorno.

Quantificarne la concentrazione per il tipo specifico può aiutare nella diagnostica veterinaria, agevolare la prognosi e seguire lo stato d'avanzamento della terapia. Queste proteine, pertanto, vengono considerate un biomarker utile negli screening sulle popolazioni. Il problema di fondo è che comunque le APP sono scarsamente specifiche per determinate patologie. Le APP si dividono in due gruppi, le negative e le positive, a seconda se l'insulto ne riduca o ne aumenti, la concentrazione plasmatica. La maggior parte delle APP positive hanno nel sangue una concentrazione bassissima, (< 1 µg/L) per aumentare anche di 1000 volte dopo 24-48 ore dall'evento stressogeno. Tra le negative le più importanti sono l'Albumina (Alb) e la Transferrina. Merita una menzione a parte la Apolipoproteina A1 (APO A1) la cui ridotta produzione a causa di processi infiammatori potrebbe essere un importante fattore causale della lipidosi epatica, in quanto la APO A1 è coinvolta nel meccanismo d'esportazione dei trigliceridi dal fegato al sangue circolante. Il più popolato gruppo delle APP positive è costituito essenzialmente da

Aptoglobine (Ap), Proteina C reattiva (PCR), Proteina siero amiloide (SSA), Ceruloplasmine (Cp), Fibrinogeno e altre minori d'importanza. Le APP positive sono essenzialmente glicoproteine sintetizzate dalle cellule epatiche (epatociti), sotto la stimolazione delle Citochine e riversate nel sangue. Esiste tuttavia anche una possibile produzione extraepatica di APP. Come detto in precedenza sono le Citochine pro-infiammatorie il principale fattore di modulazione nella produzione delle APP epatiche. Le citochine sono ormoni proteici comuni ai mammiferi, uccelli, rettili e pesci e quindi evolutivamente molto antichi. Le principali citochine coinvolte sono la Interleuchina-6 (IL-6), l'Interleuchina-1-beta (IL-1-beta) e il Fattore di necrosi tumorale TNF-alfa. Queste citochine sono rilasciate dai macrofagi, ma anche da altri tipi cellulari, in risposta a stimoli esterni o interni come tossine batteriche o alterazioni locali. La IL-6 può essere prodotta anche dalle cellule di Kupffer e dai cheratinociti e nell'ipofisi. Il meccanismo generale di produzione delle APP è descritto da H. Murata ed altri nella tabella allegata. Stress fisici e psicologici possono stimolare la produzione di IL-6 attivando l'asse ipotalamo-ipofisi-surrenali (HPA) inducendo una produzione locale, intra-pituitaria, e sistemica, di citochine. Incrementi nella sintesi epatica di APP si osservano al parto e nel periparto, a causa degli estrogeni e dello stress tipico di questa fase del ciclo produttivo della vacca da latte. Esiste anche da parte dell'HPA, attraverso la produzione di glucocorticoidi, la possibilità di modulare la produzione di citochine. Delle molte APP ormai individuate nelle varie specie animali l'Aptoglobina (Hp) e la proteina siero amiloide (SAA) sono le più significative per la bovina da latte. L'**aptoglobina (Hp)** è una μ_2 -globulina dotata di molte attività biologi-

che e la troviamo coinvolte in molte patologie della vacca da latte. Viene sintetizzata dalle cellule epatiche ed ha una configurazione molto simile all'emoglobina, con la quale forma dei complessi irreversibili. Quando, nel corso dell'emolisi, si libera dai globuli rossi l'emoglobina, la Hp forma con essa i complessi che evitano perdite renali di emoglobina e quindi di ferro. Questi complessi sono rapidamente rimossi dal sangue dalle cellule epatiche di Kuffer e dai macrofagi. L'emivita normale delle Hp è di 5.5 giorni. La funzione primaria è quella di prevenire i danni renali derivanti dall'escrezione della emoglobina ed ha un ruolo fondamentale nel controllo dei processi infiammatori locali. Il complesso Hp-Hb previene la perossidazione dei lipidi. Hp è un potente agente batteriostatico naturale sottraendo a batteri come *E.Coli* la possibilità di utilizzare il ferro contenuto nell'emoglobina. Ci sono processi infiammatori che stimolano la produzione di questa APP senza che venga liberata emoglobina. Conseguentemente ad una stimolazione immunitaria la Hp può aumentare la propria concentrazione di 100 volte rispetto al suo valore normale. La Hp si lega con emoglobina libera nel sangue formando dei complessi Hp-Hb molto stabili. Questo intervento limita fortemente lo stress ossidativo associato all'emolisi e quindi alla presenza di ferro nel plasma. Questa azione di limitazione indiretta della disponibilità di ferro, oltre all'effetto anti-ossidante prima descritto, ha anche la funzione di rendere il ferro indisponibile per la crescita batterica. Il complesso Hp-Hb presenta dei recettori specifici per i macrofagi. È stata evidenziata per la Hp una attività immuno-modulatrice e d'inibizione del "Respiratory burst" dei fagociti. Molte sono le infezioni e le patologie in cui si osserva un incremento nella produzio-

ne di Hp. Nelle infezioni da *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, BVDV, BRSV, nel corso di mastiti, malattie respiratorie, la castrazione, la mastite, la metrite e contaminazione uterine batteriche e la lipidosi epatica.

Per l'analisi quantitativa in laboratorio della Hp o del complesso Hp-Hb ci sono diversi metodi di laboratorio come l'immunodiffusione e l'elettroforesi capillare. La determinazione della Hp viene utilizzata per diagnosticare la presenza e la gravità di risposte infiammatorie a mastiti, polmoniti, enteriti, peritoniti, endocarditi, ascessi ed endometriti. Alcune applicazioni specifiche sono state individuate per valutare l'efficacia di trattamenti antibiotici nelle bovine con mastiti puerperali e monitorare l'evoluzione delle contaminazioni batteriche dell'utero dopo il parto. Allo scopo, in un lavoro di Huzzey ed altri del 2009, è stato osservato che bovine con metriti di media ed elevata gravità hanno presentato rispetto alle bovine sane del controllo, nei 12 giorni successivi al parto, un picco di Hp, al 3° giorno, per metriti di media gravità e al 6° giorno per quelle più gravi. Le sane avevano pre-

sentato un valore medio di Hp di 0.58 ± 0.12 g/L al 3° giorno e 0.31 ± 0.08 g/L al 6° giorno. Le bovine con metriti presentarono segni clini di metrite di media gravità oltre 8.6 giorni dopo il parto e di alta gravità a 5.3 giorni. Bovine che al 3° giorno dopo il parto presentano un valore di Hp ≥ 1 g/L hanno 6.7 volte più probabilità di sviluppare una metrite.

Questo valore predittivo ha, nell'analisi degli autori, una sensibilità del 50% ed una specificità dell'87%. La determinazione dell'Hp può essere utilizzata per misurare lo stress associato al trasporto dei vitelli e per la prognosi dei parti distortici, ed altre applicazioni. Un'altra proteina della fase acuta significativa per la rilevazione di stati patologici della vacca da latte è la **Proteina siero amiloide (SAA)** la cui difficile determinazione in laboratorio ne può limitare la diffusione come supporto diagnostico. La SAA appartiene al gruppo delle APP positive ossia correlate positivamente con un processo patologico. Sperimentalmente e nelle ricognizioni di biochimica clinica si è osservato una maggiore concentrazione plasmatica di SAA in concomitanza d'infiammazio-

ni, mastiti, infezioni di *Pasteurella multocida*, BVRV, BVDV, digiuno di almeno 3 giorni e la chetosi.

A differenza della Hp è stata rilevata una produzione di SAA anche nella mammella. Specifiche considerazioni sono state fatte relativamente alla possibilità di individuare nella SAA uno specifico biomarker per le mastiti e la qualità del latte.

La concentrazione di SAA nel siero di bovine con mastiti naturali o indotte sperimentalmente si innalza proporzionalmente alla gravità dell'infezione. In un esperimento basato su infezioni sperimentali della mammella da *Streptococcus uberis* si è osservato un incremento di questa proteina nel latte prima dell'innalzamento delle cellule somatiche. In un altro recente esperimento di un gruppo di ricercatori svedesi si è visto che livelli diversi di Hp e SAA nel latte sono correlati con alcuni aspetti qualitativi del latte. Un innalzamento della concentrazione di APP corrisponde ad una riduzione di proteina del latte, caseina e lattosio e quindi potrebbero essere un potenziale marker per gli aspetti qualitativi del latte.

A conclusione di questa rassegna è chiaro che le per le proteine della fase acuta la determinazione può essere interessante, non solo per monitorare processi infiammatori, ma anche per effettuare diagnosi o prognosi o verificare l'andamento di una determinata malattia e comunque per valutare un generico stato di salute della mandria. Ulteriori applicazioni possono essere estese a processi non infiammatori come la gravidanza, il parto, le malattie metaboliche, lo stress e la qualità del latte. Un progredire delle conoscenze sulle APP e soprattutto la standardizzazione delle metodiche diagnostiche potrebbe aiutare a monitorare lo stato di salute e di comfort degli animali d'allevamento contribuendo ulteriormente nel processo di garanzia del benessere animale e di conseguenza del consumatore.

Network sull'induzione e regolazione della sintesi delle app (H. Murata et al. 2004)

