

PATOLOGIA CLINICA 1 (prof. Panno & Catalano) Appunti COMPLETI di Azzurra Mandolito

La Medicina di Laboratorio o Patologia Clinica fornisce all'utente, attraverso l'esame di campioni biologici, informazioni clinicamente efficaci ed a costi adeguati, utili per ridurre il margine di incertezza delle decisioni che possono essere prese in relazione a quesiti diagnostici, prognostici o di sorveglianza correlati allo stato di salute.

Cosa sono gli analiti? Si definisce analita una specie chimica che deve essere determinata durante un'analisi chimica. L'individuazione dell'analita è una parte fondamentale nella definizione del problema analitico.

CICLO ANALITICO: Ciò che caratterizza un esame di laboratorio è il ciclo analitico, un insieme di processi che caratterizzano l'esame stesso e che a sua volta comprende:

- **Fase Pre-Analitica:** identificazione e/o preparazione del paziente/utente, trasporto dei campioni, corrispondenza tra paziente/utente foglio di richiesta e provette, congruità e qualità del campione.
- **Fase Analitica:** gestione accurata degli analizzatori e dei materiali dedicati, efficienza degli analizzatori, esecuzione esami, controllo prima di validazione risultati;
- **Fase Post-Analitica:** stoccaggio e conservazione dei campioni per ripetizioni e integrazioni, acquisizione dei risultati validati, consegna del referto all'utente.

Il ciclo analitico avviene in maniera differente a seconda dei livelli di automazione, si hanno infatti tre categorie: **-Bassa automazione -Media automazione -Alta automazione.**

La fase che cambia maggiormente nelle tre diverse categorie è la fase pre-analitica: Nei laboratori a bassa automazione si ha una registrazione manuale del campione, l'inserimento manuale nei macchinari e la verifica del corretto funzionamento del macchinario stesso. Questo ovviamente causa un consumo maggiore di tempo. Nei laboratori a media automazione la registrazione può essere manuale, ma la verifica del sistema gestionale avviene in modo automatico. Nei laboratori ad alta automazione è tutto automatico.

Un'altra differenza può essere colta nella fase **post-analitica**: Nei laboratori a bassa e media automazione è necessaria una validazione dei risultati, effettuata dal dirigente medico o dal dirigente biologo, che validano gli esami tramite il computer. **Validare** significa visionare il campione per capire se ci sono stati errori durante l'analisi. Una volta che il risultato è validato, il referto viene firmato ed inviato. Nei laboratori ad alta automazione è possibile invece effettuare l'autovalutazione, che avviene tramite sistemi di allarme che rilevano eventuali errori analitici. Nel caso in cui ci si rendesse conto che il campione è emolitico, sarebbe comunque necessario l'intervento dell'operatore, perché far ripetere l'esame su quel campione sarebbe inutile. Prendere una decisione clinica è un processo complesso basato su una serie di elementi, tra i quali:

- **Storia clinica** del paziente, dà al medico le informazioni utili per postulare un quesito diagnostico.
- Esame **obiettivo**, consente di arrivare a una diagnosi.
- Esami di **laboratorio e strumentali**, sono gli esami che permettono di formulare un referto.

Lo scopo è ricavare informazioni utili a stabilire: Lo **stato di malattia** del paziente; La **gravità** della condizione clinica; La **velocità** e le opportune **modalità** di intervento. Fondamentalmente in laboratorio si eseguono:

- Delle **misure** (in laboratorio si vanno a dosare i diversi campioni biologici)
- Delle **osservazioni** (alcuni esami si basano su osservazioni come le indagini microscopiche, per attenzionare particolari alterazioni).

Classificazione funzionale dei laboratori - Esistono due tipi principali di laboratori:

1. **Laboratori generali di base:** in cui convergono tutte le discipline sopra citate e in cui vengono eseguiti analisi e dosaggio di analiti.

2. **Laboratori specializzati:** comprende branche che possono inglobare più discipline o una sola di queste, ad esempio laboratori di: -Chimica Clinica e Tossicologica; -Ematologia; -Microbiologia e sieroinmunologia; -Citoistopatologia; -Virologia; -Genetica medica; -Laboratorio con ricerca di base.

Attualmente i professionisti di laboratorio comprendono: -**Medici - Biologi/Chimici:** Validano il dato e controllano che sia attendibile - **Tecnici di Laboratorio:** Sono i responsabili dell'interfaccia con i macchinari - **Fisici, Ingegneri, Informatici etc.:** il processo è sempre più automatizzato e informatizzato, per questo motivo c'è sempre bisogno di figure specialistiche.

Compiti di un professionista di laboratorio: Fornire un servizio di consulenza clinica supportato da adeguata tecnologia diagnostica nel laboratorio, al letto del malato, negli ambulatori medici, capace di coprire tutti gli aspetti delle indagini di laboratorio inclusi l'interpretazione dei risultati e suggerimenti per le successive indagini.

TOTAL LAB AUTOMATION: una catena in grado di trasportare fisicamente i campioni biologici agli analizzatori e ai moduli pre- e post- analitici. Questo comporta:

- Riduzione del **TAT** (Turn around time): cioè il tempo che intercorre per avere il risultato di un determinato dato di laboratorio;
- Semplificazione nella gestione dei campioni: essendo fatto tutto in maniera automatica, è più semplice gestire il flusso di campioni.
- Riduzione dei costi: riduzione degli operatori (principalmente Tecnici di laboratorio).

LABORATORIO GENERALE

1. Core Laboratory: Caratterizzato da una completa informatizzazione, dal trattamento dei campioni all'archiviazione della risposta, con l'utilizzo di impianti comuni e di comuni procedure di controllo per le diverse discipline: -Ematologia; -Chimica Clinica; -Microbiologia Clinica; -Immunologia clinica di base. Sono necessariamente laboratori "certificati" da Enti esterni che verificano la conformità delle procedure e dei metodi utilizzati dagli standard nazionali ed internazionali previsti dalle normative vigenti in materia.

2. Hub E Spoke : **Hub:** Centro di eccellenza che concentra tutte le attività laboratoristiche (hanno flussi maggiori). **Spoke:** Centri periferici che svolgono tutti gli esami di base ed inviano campioni per indagini più complesse o specialistiche agli Hub territoriali di riferimento. *Ad esempio, a Cosenza l'Hub è rappresentato dal laboratorio di analisi dell'Ospedale di Cosenza, mentre gli Spoke sono rappresentati dalle strutture negli ospedali dei paesi vicini.*

LABORATORIO SPECIALIZZATO: Fornisce prestazioni diagnostiche specializzate ad elevato livello tecnologico e professionale nell'ambito: -*Della biochimica clinica e tossicologica;* -*Dell'ematologia ed emocoagulazione;* -*Dell'immunoematologia;* -*Microbiologia e virologia;* -*Citogenetica;* -*Patologia molecolare.* Utilizzano, quindi, tecnologie dedicate ma con procedure generali comuni ai *core lab*.

LABORATORIO DI REPARTO (POCT: Point-of-care testing) : Laboratorio di piccole dimensioni utilizzato nei reparti ospedalieri. Utilizzano procedure completamente automatizzate, ma sempre sotto controllo di personale altamente qualificato con specifiche competenze nel campo di applicazione. Lo scopo dei POCT è quello di poter ottenere risultati analitici in tempi brevissimi su pannello limitato di analiti. Questi laboratori si trovano in reparti specifici: -**Dipartimenti di emergenza;** -**Strutture di terapia intensiva;** -**Sale operatorie.**

MATERIALI BIOLOGICI:

• **Sangue intero, plasma o siero** che possono essere ottenuti tramite prelievo da **vene** (più richiesto), **arterie** (per esempio l'EGA) o **capillari** (per esempio dal reparto nei reparti di neonatologia dove è complesso ricavare sangue venoso); • **Urine** (raccolta diretta da parte del paziente) • **Feci** (raccolta diretta da parte del paziente) • **Liquido cerebro-spinale** (rachicentesi)

• **Liquido peritoneale** (paracentesi) • **Liquido pleurico** (toracentesi) • **Liquido pericardico** (pericardiocentesi) • **Liquido sinoviale** (artrocentesi) • **Liquido amniotico** (amniocentesi) • **Liquido seminale** • **Latte materno** • **Saliva** • **Sudore** • **Capelli** • **Tessuti solidi** (asportati tramite biopsia o intervento chirurgico) • **Midollo osseo** (prelievo o biopsia midollare) • **Segreto bronchiale** (Aspirato/Lavaggio tracheo-bronchiale o BAL=Lavaggio bronco alveolare) • **Succo gastrico** • **Secreti**: faringeo, nasale, auricolare, uretrale, da ferita, da drenaggi.

Su ognuno di questi materiali è possibile dosare varie sostanze indicate col nome di **ANALITI**.

LE ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE: Le analisi biochimico-cliniche sono le analisi “di base” che vengono effettuate come primo screening e danno informazioni sull’assetto metabolico e sulla maggior parte di organi e apparati. Vengono eseguite sotto forma di:

-**Analisi singole** (*ad esempio dosaggio glicemia, colesterolo, creatina*).

-**Raggruppamenti storici, strumentali, profili biochimici:** sono profili predefiniti che vengono richiesti per creare un profilo di base, ad esempio esami della funzionalità epatica, renale ed elettroliti. In ospedale si distingue il profilo medico da quello chirurgico, perché le analisi richieste differiscono in base al reparto in cui si è ricoverati.

-**Prove di funzionalità dinamiche e metaboliche**, utilizzati soprattutto in ambito endocrinologico, ad esempio il dosaggio di determinati ormoni.

-**Esami di screening.**

-**Esami urgenti:** solo ambito ospedaliero, presenti h24. Ad esempio, l’emocromo, la coagulazione, il profilo chimico-clinico di base in cui rientrano il dosaggio della funzionalità epatica, renale, elettroliti, dosaggio troponine.

Esistono pannelli analitici standardizzati, come il *pannello metabolico di base* o il *pannello metabolico allargato*, il *pannello della funzionalità epatica*, il *pannello dell’epatite acuta*, il *pannello della funzionalità renale*, il *pannello degli elettroliti* e così via.

Aspetti fisio-metabolici da considerare nella richiesta di un esame di laboratorio:

- Struttura o natura dell’analita - Origine - Distribuzione nell’organismo - Modalità di eliminazione o escrezione - Tempo biologico di dimezzamento - Meccanismi di controllo - Variazioni fisiologiche e circadiane (*importantissimo ad esempio nel caso del cortisolo*) - Per un farmaco: struttura, farmacocinetica, metaboliti attivi, clearance, legami proteici, interazioni con altri farmaci.

IL LABORATORIO CLINICO NEL PROCESSO DIAGNOSTICO: Le analisi vengono richieste da un medico curante o un medico specialista; poi giungono al laboratorio, in cui vengono effettuati i dosaggi degli analiti richiesti, ed infine tornano nuovamente al medico richiedente. Il percorso di un esame di laboratorio dalla richiesta alla risposta e, quindi, all’intervento medico è indicato come Total Testing Process (TTP).

RICHIESTA DI ANALISI: Deve contenere:

- **Identificazione:** dati demografici personali (anagrafica, data ricovero, medico curante...) dati relativi al prelievo (tipologia campione, giorno e ora prelievo)
- **Motivazione della richiesta:** ipotesi diagnostica, diagnosi d’ingresso, dubbi da dirimere
- **Condizioni del paziente:** distanza ultimo pasto, trasfusione, terapie generali, ora assunzione
- **Prestazione richiesta:** identificata in maniera univoca utilizzando i nomenclatori ufficiali Nazionali e Regionali. *Opportuni sistemi di codifica (codici a barre...) permettono di collegare positivamente e senza errore l’etichetta applicata al prelievo e la relativa richiesta, cartacea o elettronica.*

• **Referto analitico.** Una volta validato il dato, il Laboratorio rilascia il referto analitico, costituito da:

1. Identificazione del campione (es. *esami ematochimici, esame liquido seminale ecc...*)
2. Esame eseguito e dato analitico (es. *Glucosio*, seguito dal suo valore)
3. Valori di riferimento
4. Riferimenti tecnici e metodologici (es. *Colesterolo - metodo enzimatico*)

Il referto analitico deve essere archiviato per un periodo di tempo **non inferiore a due anni**.

Assicurazione di Qualità: Qualità è l'insieme delle caratteristiche di un prodotto o di un servizio che consente di soddisfare una determinata necessità (*American Society of Quality Control*).

Il sistema di qualità è fondamentale poiché permette di fornire dati quanto più possibile attendibili, nonostante alcuni errori si verifichino ugualmente.

Il controllo della qualità consiste nel disporre di: -Definizione e stesura scritta delle procedure; - Monitoraggio continuo della qualità del processo analitico; -Valutazione dell'efficacia delle procedure di assicurazione di qualità; -Correzione dei problemi; -Assicurazione di una refertazione accurata; - Assicurazione dell'adeguatezza e competenza del personale.

NORME DI QUALITÀ' (Importante!)

- **UNI EN ISO 9001:2015** "Sistemi di gestione per la qualità": Norma internazionale, recepita in Italia dall'UNI, l'Ente Nazionale di normazione, che fissa i requisiti standard di un sistema di gestione per la qualità.

- **ISO 15189:** norma che riguarda specificatamente le attività di laboratorio clinico.

Il raggiungimento della Qualità si basa sul *continuo adattamento dell'organizzazione e del lavoro rispetto all'obiettivo prefissato*. Lo schema logistico utilizzato a questo scopo è il **Ciclo di Deming: Plan, Do, Check, Action**, noto con l'acronimo **PDCA**.

PLAN: Pianificare le attività e gli obiettivi; Prevedere i risultati; Programmare le verifiche.

DO: Mettere in opera quanto pianificato. Seguire i protocolli descritti sul SQ (Sistema di Qualità).

CHECK: Verificare i risultati ottenuti con indicatori oggettivi. Nel caso dell'Ospedale, esiste un Capo Dipartimento che richiede degli obiettivi che devono essere raggiunti.

ACTION: Apportare le modifiche nelle attività che non hanno raggiunto gli obiettivi.

Il Sistema di Qualità, che si costruisce utilizzando il Ciclo di Deming, è costituito dall'insieme di tutti i documenti che descrivono il Laboratorio secondo la norma presa in riferimento. Esso costituisce la base e il prerequisito per ottenere Accredитamento e/o Certificazione.

Accreditamento: (riconoscimento formale dell'idoneità di un laboratorio ad effettuare specifiche prestazioni diagnostiche) è un requisito di legge che occorre acquisire per poter erogare prestazioni ai clienti, che accedono alla struttura sotto la copertura del sistema sanitario regionale. Le strutture ospedaliere sono già accreditate e certificate, mentre alcuni laboratori presenti sul territorio possono essere solo accreditati o solo certificati.

Certificazione: è su base strettamente volontaria. È il laboratorio che chiede ad un Ente certificatore di essere ispezionato per certificare la propria aderenza al sistema ISO 15189. *Un laboratorio può essere ad esempio solo certificato per la chimica clinica, ma non accreditato. Quindi si possono effettuare le analisi, ma non sotto la copertura del Sistema Sanitario Nazionale, quindi senza accettare le ricette mediche.*

Valutazione della qualità

- **Valutazione della struttura:** complesso delle risorse umane, fisiche, tecniche, finanziarie ed organizzative.

- **Valutazione del processo:** tutto quello che gli operatori fanno per gli assistiti e quello che fanno i pazienti per curarsi.

- **Valutazione dell'esito:** quello che si riesce a fare a favore di un singolo assistito: -il grado di conoscenza della propria malattia -il cambiamento di comportamento favorevole al miglioramento della salute - soddisfazione di chi riceve l'assistenza.

La **variabilità totale** di un dato dipende anche dal percorso che il campione biologico affronta all'interno del laboratorio di analisi. Dunque, si rende necessario considerare:

- La **relatività della misura** generata dall'insieme di tutti quei processi che avvengono durante ciclo analitico, in particolar modo durante fase pre-analitica (sono rilevanti anche le fasi successive).
- La **variabilità biologica** distinta a sua volta in:
 - o **Variabilità biologica intraindividuale**, ovvero le abitudini alimentari del soggetto.
 - o **Variabilità biologica interindividuale**, varia, a seconda dell'età, del sesso e della razza e della condizione del paziente. Alcune di queste variabili incidono sullo stato del paziente.

Perciò, la **variabilità analitica totale** di un dato di laboratorio è data dall'insieme di tutti gli eventi che si possono verificare durante le tre tappe costituenti il ciclo analitico.

Si riprende ora il ciclo analitico e in particolare la fase PRE ANALITICA: Questa fase è antecedente al momento del dosaggio del campione e abbraccia l'arco temporale che fa dalla preparazione del paziente alla conservazione del materiale biologico.

Fenomeno successivo al prelievo del campione è la sua **manipolazione** (che dovrà avvenire correttamente), successivamente il materiale biologico verrà trasportato presso il laboratorio analisi. La raccolta del campione può avvenire in casa, direttamente in laboratorio o in strutture quali un ospedale. Il trasporto può essere:

- **Trasporto intramurale:** Avviene all'interno della stessa struttura dove è stato effettuato il prelievo (ad esempio, quando il campione biologico viene raccolto in reparto).
- **Trasporto extramurale:** Avviene quando il campione viene trasportato in una struttura differente da quella dove è avvenuta la sua raccolta.

Una volta arrivato nel laboratorio, il campione biologico deve essere accettato, ulteriore passaggio che dovrebbe avvenire correttamente. Successivamente all'**accettazione**, si procede sequenzialmente: - Alla **sieratura** e **centrifugazione** (nel caso del sangue) - Allo **smistamento** ai vari settori analitici - All'**analisi** del campione. - **Conservazione** del materiale biologico.

Come già detto, nella fase preanalitica si ha inizialmente la preparazione del paziente, il quale deve essere preparato ad affrontare il tipo di esame a cui dovrà essere sottoposto. Per alcuni tipi di campione è necessario istruire il paziente e prepararlo affinché ci sia un'ideale raccolta del materiale biologico. Per quanto concerne gli esami generali (di routine), ad esempio quelli effettuati su campioni di sangue (ematocimici generali, di base e metabolici), è necessario un digiuno di almeno 8 ore. Infatti, la maggior parte delle analisi vengono effettuate al mattino proprio per assicurare il digiuno di almeno 8 ore (le 8 ore indicano il tempo necessario per il dosaggio della maggior parte degli analiti). Chiaramente, se ancora una volta ci si dovesse trovare in situazioni di emergenza il digiuno non sarà assicurato. Dunque, il procedimento delle 8 ore di digiuno non fa riferimento a situazioni di urgenza/emergenza.

Un'altra condizione che deve essere considerata e che rientra nella preparazione del paziente è la conoscenza di alcune abitudini di vita del paziente stesso. È necessario segnalare: - Se si tratta di un fumatore. - Se ha effettuato attività fisica intensa. - Se si trova in una condizione di stress.

In alcuni casi i prelievi vengono effettuati in un determinato periodo di tempo, come nel caso del dosaggio del **cortisolo**. Per effettuare questo tipo di dosaggio è fondamentale che il prelievo venga effettuato al mattino presto e nel pomeriggio, proprio perché i valori del cortisolo variano in base al **ritmo circadiano**. Un altro esempio in cui il periodo del prelievo è fondamentale è nel dosaggio ormonale, per esempio, nelle donne in età fertile. In particolare, quando si vogliono analizzare le **gonadotropine**, quindi i livelli di **estradiolo** e i livelli di **progesterone**, va preso in considerazione il ciclo mestruale. Altro elemento fondamentale per il dosaggio di alcuni analiti è la **dieta**. Se bisogna raccogliere il **liquido seminale** di un paziente di sesso maschile è necessario un periodo di astinenza che va dai 3 ai 5 giorni; questo tipo di analisi viene effettuato per valutare la capacità riproduttiva del soggetto, per evidenziare il numero di spermatozoi e la loro motilità.

Il **sangue** e l'**urina** sono i campioni biologici più utilizzati ma, possono essere studiati anche: - **Essudati**; **Saliva**; **Feci**; **Tessuti**, il cui prelievo avviene a seguito di interventi chirurgici (come nel caso dell'asportazione di una determinata formazione).

Nel caso del prelievo del sangue (il fluido corporeo più frequentemente utilizzato per effettuare le analisi) è necessaria l'attività di un infermiere, che deve attenersi ad una serie di norme standardizzate fondamentali; in quanto, errori in questa fase possono alterare il risultato e rendere quindi non attendibile il dato analitico.

IL PRELIEVO DEL CAMPIONE EMATICO: In primo luogo, è fondamentale che venga preparato tutto il materiale necessario per il prelievo, come le **provette** in cui il campione di sangue verrà raccolto. In generale, **il campione di sangue più utilizzato è quello di tipo venoso**, per mezzo di questo è possibile eseguire il dosaggio di molteplici analiti.

Il colore del tappo della provetta cambia in base al tipo di sangue che deve contenere; dunque, l'operatore sulla base della richiesta di analisi preleva correttamente il sangue e lo inserisce nelle provette utilizzate per il dosaggio dell'analita richiesto. In alcuni dosaggi si rende inoltre necessario che, dopo il prelievo, i campioni vengano posizionati nel ghiaccio.

Il **prelievo venoso** viene effettuato in corrispondenza della piega del gomito attraverso le **vene cubitali** (zona generalmente più accessibile per ottenere il campione); ovviamente ci sono delle eccezioni e in tal caso si ricorre ad altre sedi corporee. Infatti, in alcuni casi come i neonati, il prelievo venoso risulta essere molto difficoltoso; per questa motivazione si utilizza nel neonato il **sangue capillare**, si parla perciò di "**prelievo cutaneo**" (generalmente si utilizzano i lobi dell'orecchio o il piede).

Il prelievo cutaneo viene effettuato anche per **l'automonitoraggio dei pazienti diabetici** (mediante una piccola ferita, solitamente sulla falangetta, si raccoglie una goccia di sangue per monitorare la **glicemia**).

Si può affermare che, in linea generale, non si riscontrano molte differenze nei valori che si ottengono dal prelievo del sangue venoso e i valori ottenuti dal prelievo del sangue capillare.

Un altro tipo di prelievo proviene dalle arterie e si definisce **prelievo arterioso**, effettuato in particolari tipi di analisi come nel caso **dell'emogasanalisi**. Per il prelievo arterioso si utilizzano prevalentemente:

- Le **arterie radiali**; si procede immobilizzandola, quindi tenendo le dita a cavallo dell'arteria, e poi effettuando il prelievo stesso.
- Le **arterie femorali**.
- Le **arterie brachiali**.

Il prelievo arterioso è realizzato sempre in ambiente ospedaliero e risulta essere più complesso rispetto al prelievo venoso.

IL PRELIEVO DEL SANGUE VENOSO: Come anticipato è il prelievo più utilizzato. Per effettuare il prelievo di tipo venoso bisogna primariamente preparare il paziente:

- Si fa distendere comodamente il braccio su un supporto. - Attraverso l'utilizzo del laccio emostatico si individua la vena cubitale. - Si disinfetta la zona. - Si inserisce direttamente l'ago in vena. - Dopo aver effettuato il prelievo, prima di togliere l'ago, il laboratorista scioglie il nodo del laccio emostatico.
- Comprimere il punto del prelievo con un tampone imbevuto di disinfettante.

Oggi si utilizzano soprattutto i **vacutainer**, dei dispositivi che sfruttano un sistema sottovuoto per richiamare il sangue direttamente dall'ago senza creare condizioni di stress particolari; situazioni che si presentano piuttosto frequentemente nel caso dell'utilizzo di siringhe, le quali durante il prelievo creano una forzatura nello stantuffo che potrebbe comportare delle condizioni di **emolisi**, e quindi generare errori nella fase preanalitica che inevitabilmente si ripercuoteranno nelle fasi successive. Nel caso del vacutainer il sangue è immesso direttamente nella provetta che una volta riempita, potrà essere sostituita con un'altra provetta dando così la possibilità di riempire più provette facilmente durante lo stesso prelievo senza incorrere ad emolisi. Una volta effettuato il prelievo, **ogni provetta deve essere capovolta gentilmente per 3 volte**.

TIPI DI CAMPIONE DI SANGUE: Il campione ematico maggiormente utilizzato è quello contenente il **sangue intero**, che si ottiene prelevando il sangue venoso dalla provetta contenente un apposito anticoagulante. Il sangue intero si ottiene senza sedimentazione e centrifugazione, in quanto è utilizzato in toto. Un prelievo di questo tipo si effettua, ad esempio, per l'*emocromo*; la provetta utilizzata in questo caso ha il tappo di colore **viola**. Il sangue intero è spesso utilizzato nel caso in cui è necessario valutare la componente cellulare del sangue. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, il dosaggio degli analiti avviene attraverso l'analisi del **plasma** o del **siero**.

- Il **plasma** si ottiene dal sangue intero trattato con anticoagulanti; quindi, è necessario utilizzare una provetta per il sangue intero in cui è già presente l'anticoagulante. Successivamente al prelievo, il sangue viene centrifugato; in questo modo sedimenta naturalmente e porta alla divisione della parte corpuscolata (che si depositerà sul fondo della provetta) dal plasma (che si depositerà in superficie).

- Il **siero**, invece, si ottiene dal sangue intero inserito in una provetta sprovvista di anticoagulante; in questo modo, si attende che il sangue coaguli spontaneamente e per poi procedere con la centrifugazione (in seguito alla quale sarà evidente la divisione tra parte corpuscolata e siero).

Un altro tipo di studio e di analisi viene effettuato attraverso il **sangue essiccato su carta**. Questo si ottiene facendo assorbire direttamente il sangue da un'apposita carta assorbente, si tratta di un tipo di prelievo utilizzato soprattutto quando l'analita deve essere trasferito da una struttura all'altra. Anche in questo caso il sangue è intero: - Lo si lascia asciugare a temperatura ambiente. - Si procede con il dosaggio degli analiti.

È una tecnica utilizzata soprattutto per lo **screening neonatale dell'ipotiroidismo congenito**, si tratta di uno screening obbligatorio per tutti i neonati e che consiste nel dosaggio del TSH; permette di identificare precocemente stati di ipotiroidismo congenito. In questo modo è possibile agire con un trattamento immediato, poiché la carenza di ormoni tiroidei o la loro assenza determina gravi danni cerebrali, in particolare, il **cretinismo**. Per effettuare questo screening, tutti i campioni di carta assorbente contenenti il sangue vengono inviati ai centri di riferimento regionali per l'ipotiroidismo.

IL COLORE DEL TAPPO DELLA PROVETTA: Il liquido che più si avvicina alla composizione reale del sangue è il **plasma**, ma moltissimi sono gli analiti dosati sul **serio**: infatti, la chimica clinica di base viene quasi tutta effettuata sul serio poiché il risultato ottenuto è molto simile a quello del plasma ma, soprattutto, il risultato è affidabile. Ogni provetta contiene al suo interno una specifica quantità di anticoagulante; affinché si possa ottenere un buon risultato sarà essenziale che il sangue venga miscelato con la corretta dose di anticoagulante, in quanto un suo uso scorretto altera il risultato.

- La provetta con il tappo **viola** è utilizzata per il dosaggio del sangue intero. Contiene **acido etilendiamminotetracetico (EDTA)**.
- La provetta con il tappo **rosso/bordeaux** è utilizzata per ottenere il siero (ricordiamo che si ottiene da sangue intero senza anticoagulanti).
- La provetta con il tappo **nero** contiene citrato e viene, invece, utilizzata per il dosaggio della **VES** (velocità di sedimentazione degli eritrociti).

È fondamentale che l'anticoagulante scelto non interferisca direttamente con le analisi analitiche. Il **vacutainer** risolve anche il possibile problema di sbagliare con le quantità in quanto, essendo un sistema sottovuoto, la provetta si riempie spontaneamente per intero creando una miscela tra l'anticoagulante e il sangue.

L'IMPORTANZA DELL'ANTICOAGULANTE NELLA PROVETTA: Uno tra gli anticoagulanti maggiormente utilizzati è l'**eparina**, l'anticoagulante naturale del sangue circolante in quanto è già presente nel nostro corpo a concentrazioni più basse rispetto a quelle presenti nella provetta. L'eparina è un **mucopolisaccaride acido**, si trova in commercio come: sale di sodio, potassio, di ammonio o di litio.

Lo **svantaggio** nell'utilizzare l'**eparina** è il suo elevato costo e la sua attività limitata nel tempo: l'eparina ha una scadenza a breve termine, perciò, se non utilizzata entro l'arco di tempo stabilito dovrà essere gettata.

Inoltre, l'*eparina* è anche un **cofattore dell'antitrombina III plasmatica** in collaborazione con la quale inattiva rapidamente il *fattore Xa* (attivato) bloccando la formazione della *trombina* e, di conseguenza, anche la trasformazione del *fibrinogeno* in *fibrina*.

L'eparina interferisce poco nelle analisi ematochimiche, perciò può essere utilizzata nelle **indagini ematologiche** escluse quelle di tipo morfologico (dove si preferiscono altri tipi di anticoagulante).

Altri anticoagulanti utilizzati sono:

- Gli **ossalati di sodio** (maggiormente utilizzato). - Gli **ossalati di potassio**. - Gli **ossalati di litio**.

Esplcano un effetto anticoagulante in quanto sono **chelanti del calcio**, ossia si legano stabilmente agli ioni calcio; di conseguenza gli ioni calcio non sono più disponibili in quantità sufficienti per permettere la normale coagulazione.

L'anticoagulante maggiormente utilizzato, in particolar modo nelle indagini ematologiche e per l'esame morfologico del sangue, è l'**EDTA** (contenuto specialmente nelle provette dal tappo viola). L'EDTA è anch'esso un chelante degli ioni calcio, costituisce l'anticoagulante d'elezione per l'emocritometria in quanto conserva in modo inalterato la componente cellulare (si usa soprattutto per lo studio della componente corpuscolata del sangue, in particolare nell'esame morfologico).

ERRORI NELLA FASE PRE-ANALITICA ED EMOLISI: L'uso scorretto di anticoagulanti non è l'unico errore possibile durante la fase pre-analitica. Altro errore che può verificarsi è la presenza di **emolisi**; fenomeno deve essere valutato solo nel caso di raccolta di plasma o siero (non deve essere valutato nel caso di raccolta del sangue intero). L'emolisi è una colorazione rossastra, post centrifugazione del plasma o del siero, si rende visibile ad occhio nudo quando la concentrazione di emoglobina supera i 20 mg/dl. L'emolisi può essere: - **Impercettibile** ad occhio nudo. - **Modesta**, la colorazione è più intensa. - **Elevata**, a questo punto è evidente che il campione dopo sieratura o centrifugazione presenta elevate concentrazioni di emoglobina.

La presenza di emolisi costituisce inadeguatezza dei campioni biologico; spesso accade che il laboratorista stesso debba richiedere altri campioni di sangue per ripetere l'analisi ed evitare gli errori causati dall'emolisi. L'emolisi è legata al passaggio nel plasma, o nel siero, di emoglobina e di tutti i componenti degli eritrociti, i quali hanno subito rottura. Questo fenomeno crea errori soprattutto nei **dosaggi colorimetrici** di alcuni analiti, in particolare, quelli valutati nella zona dello spettro dove anche l'emoglobina esercita un marcato assorbimento dei raggi dello spettro incidente.

La presenza dell'emoglobina interferisce con i dosaggi colorimetrici dando risultati non coerenti o affidabili. Uno dei dosaggi che più risente del fenomeno dell'emolisi è la **potassiemia** (o **kaliemia**), poiché la concentrazione di potassio presente all'interno degli eritrociti è nettamente più elevata rispetto a quella presente in condizioni normali nel plasma o nel siero; perciò, il passaggio dello ione potassio all'interno del plasma o del siero, porta al riscontro di valori di potassio non reali. Valori troppo elevati di potassio mettono a rischio la vita del paziente. Tuttavia, prima di creare allarmismi, è necessario accertarsi che questo valore elevato non sia dovuto ad un campione emolitico.

CAUSE DELL'EMOLISI: L'emolisi è un evento la cui frequenza è stata ridotta dall'avvento del vacutainer; infatti, quando si utilizzavano prevalentemente le siringhe, la pressione meccanica rendeva quasi inevitabile l'emolisi. L'emolisi può essere:

- Un'**emolisi osmotica o chimica**; quando si ha la presenza di acqua o detergenti sull'ago, nella siringa o nella provetta.

- Un'**emolisi meccanica**; legata all'aspirazione forzata al momento del prelievo oppure all'eccessiva pressione esercitata dallo stantuffo quando si trasferisce, con la siringa, il sangue nella provetta (fenomeno ridotto dal vacutainer).

Nei bambini l'accesso venoso è più limitato, in questo caso è maggiore la probabilità di emolisi meccanica.

- Un'**emolisi fisica**; dovuta a una conservazione non corretta del campione. Si verifica prima che la parte corpuscolata si divida da quella liquida (quindi prima della sieratura o centrifugazione), in genere è causata da temperature troppo basse o troppo elevate (oltre 28- 30 C°).

È fondamentale che il campione appena prelevato venga sierato e centrifugato alla corretta temperatura. Ad ogni modo, alcuni fenomeni di emolisi possono essere legati a condizioni patologiche del paziente stesso (ad esempio: *deficit di enzimi eritrocitari*).

ALTRI TIPI DI CAMPIONI: La raccolta del campione varia a seconda della matrice biologica da analizzare. Campione spesso oggetto di analisi sono le urine, raccolte direttamente dal paziente che deve quindi conoscere le procedure per effettuare il prelievo correttamente. La raccolta delle **urine** può essere di due tipi:

- **Qualitativa:** La raccolta avviene in un **contenitore sterile** e costituisce l'analisi più comune. È un metodo utilizzato, ad esempio, nel caso in cui è necessaria l'**urinocoltura** per cercare un eventuale germe causa di infezione; si procede poi con l'**antibiogramma** per associare l'antibiotico più adatto. È necessario seguire delle norme, quali: -Adeguate pulizia dei genitali. -Utilizzo di un contenitore sterile. Senza questi accorgimenti la raccolta potrebbe andare in contro a contaminazione non reale.

- **Quantitativa:** La raccolta avviene in un tempo ben preciso (di solito 24 ore), in questo caso il paziente raccoglie le urine nell'arco di un'intera giornata, escludendo il primo getto di urine (perché ricco di cellule epiteliali). Vengono utilizzati contenitori precisi, ossia dei *bidoncini*, in cui vengono inserite tutte le urine raccolte nella giornata (in quanto è fondamentale valutare il **volume finale**).

L'analisi quantitativa è utilizzata per: - Valutare la funzionalità renale (clearance renale). - Per dosaggi di molti ormoni come la *calciuria*, la *proteinuria*, ecc.

- Il campione di urina deve essere chiuso e, se non portato subito in laboratorio deve essere conservato in frigo a 4C° (per evitare proliferazione di batteri che potrebbero determinare una contaminazione del campione). Altri prelievi di campioni biologici effettuati dal paziente sono:

- La raccolta delle **feci**; effettuata se si sospetta la presenza di parassiti (in caso di sangue occulto vanno effettuati ulteriori accertamenti). Il prelievo può essere random durante la giornata oppure, in alcuni casi, si richiede una temporalità specifica (fino a 72 ore), se si vuole ad esempio studiare l'assorbimento o fare analisi di tipo metabolico.

- La raccolta del **liquor**, è effettuato da un operatore in ambiente ospedaliero mediante una puntura lombare. Si estraggono circa 15-20 ml da un soggetto adulto; il campione ottenuto viene diviso in 3 provette, in quanto vengono effettuati dosaggi di tipo: Chimico-clinici. - Microbiologici. - Microscopici-citologici (per studiare i componenti cellulari presenti). - La raccolta di **sudore, lacrime e saliva** per studiare alcuni metaboliti, ioni, farmaci e droghe da abuso. Si utilizzano kit integrati contenenti il **sistema di raccolta** del campione e il **sistema di dosaggio** del campione stesso.

L'IMPORTANZA DEL TEMPO NELL'ANALISI DEL CAMPIONE: È importante che i tempi non siano eccessivi, poiché influenzerebbero la **stabilità** della matrice biologica raccolta compromettendo il dato. In genere, il campione venoso, entro un'ora deve essere sottoposto a centrifugazione per separare la componente liquida da quella corpuscolata. Quando si effettuano test sui fattori di coagulazione i tempi devono essere ancora più brevi (anche meno di un'ora). Se si deve effettuare l'emocromo il tempo massimo è di 7 ore, la VES non oltre le 24 ore. *Alcuni campioni, dopo sieratura o centrifugazione, possono essere conservati per più tempo poiché il dosaggio di alcuni analiti può avvenire senza problemi anche dopo un periodo di tempo più lungo.*

CONDIZIONI PER IL TRASPORTO DEL CAMPIONE

• **Trasporto entro un'ora:** Dopo aver inserito il campione nel contenitore sterile, quest'ultimo viene trasportato in posizione verticale al riparo dalla luce e da qualsiasi possibilità di surriscaldamento e agitazione.

- **Trasporto in 3-4 ore:** È necessario che i campioni si trovino in posizione verticale e in ambiente refrigerato a 4C°.

- **Trasporto oltre le 12 ore:** Occorre effettuare sieratura e centrifugazione, se si deve ottenere il plasma o il siero; dopo bisogna immergere i campioni in un contenitore di polistirolo contenente ghiaccio secco affinché si congelino (così si conservano anche per un tempo di 48-72 ore).

A secondo del tempo che intercorre tra raccolta del campione e raggiungimento del laboratorio variano le procedure. Un sistema utile al trasporto di campioni in sedi più distanti è la **liofilizzazione** (poco utilizzato nella pratica clinica perché richiede personale specializzato, strumenti delicati, costi e tempi maggiori).

ANALISI DEL CAMPIONE: Una volta che il campione avrà raggiunto il laboratorio si procede con l'**accettazione** del materiale biologico. Ancora una volta i metodi di analisi variano in base al tipo di laboratorio (se privato o pubblico, dalle sue dimensioni, dalla sua automazione). In ospedale i campioni arrivano tramite *posta pneumatica*, ossia tramite un condotto cadono in un contenitore direttamente in laboratorio.

Il campione deve essere confrontato con la richiesta presente sul sistema informatico affinché possa essere validata l'accettazione. L'**accettazione** è fondamentale poiché è in questa fase che si identifica il paziente (anche questo rappresenta un errore pre-analitico frequente, anche se sulla provetta è presente il codice a barre).

Una confrontato il campione con la richiesta di analisi si può avanzare con le procedure come: **sierazione, centrifugazione e smistamento** del campione nei vari settori analitici.

Esistono alcuni criteri per cui il campione è considerato non accettabile, in questi casi non si procede al dosaggio dell'analita. Se si blocca il processo in questa fase si deve chiedere un nuovo prelievo del materiale biologico.

CRITERI DI NON ACCETTABILITÀ DEL CAMPIONE: Un'identificazione errata del paziente. - La mancanza di informazione sul test da eseguire (soprattutto per il dosaggio di alcuni analiti in particolare). - Se è presente un contenitore non idoneo o non integro o contaminato. - Se ci troviamo davanti ad una quantità di materiale insufficiente. - Un rapporto sangue-anticoagulante errato. - La presenza di coaguli * (soprattutto nelle provette di sangue intero) - Una conservazione a temperatura non corretta, come nel caso dell'emogasanalisi, può portare il campione a non essere accettato. - Congelamento e scongelamento ripetuti danneggiano il campione. - L'esposizione alla luce solare diretta. - Una errata preparazione del paziente.

** Se il coagulo è già presente nella provetta ed è visibile, viene scartato subito e si ripete il prelievo. Se il campione non evidenzia la presenza del coagulo, ma in fase di analisi si evidenziano valori particolarmente alterati è probabile che il sangue intero abbia nascosto la presenza del coagulo stesso. La prima cosa che fa il dirigente biologo, in questo caso, è riportare al laboratorista la possibile presenza di coaguli. A questo punto, il laboratorista passa il sangue in una nuova provetta per evidenziare l'eventuale presenza di coaguli (il campione non è idoneo anche se ha passato l'accettazione, quindi si deve ripetere l'esame).*

PROCESSI DI SIERATURA E CENTRIFUGAZIONE: Se il campione che giunge è sangue venoso, per ottenere il plasma o il siero si effettua sieratura e centrifugazione, tappa che varia in base al laboratorio:

- **Laboratorio a bassa automazione;** il processo è effettuato manualmente dall'operatore.
- **Laboratorio a media automazione;** il processo viene effettuato automaticamente dalle macchine che lo smistano poi nei vari settori analitici.

Un campione appena prelevato va lasciato coagulare spontaneamente a temperatura ambiente per circa 20 minuti nella stessa provetta dov'è stato raccolto, entro un'ora dal prelievo si deve procedere alla sua centrifugazione.

-- Nel caso della *raccolta di siero* (raccolto nella provetta in assenza di anticoagulante), si procede con una centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti; si ottiene il sedimento in basso e la parte liquida nella parte

superiore della provetta. Lo step successivo è la divisione delle due parti, le quali verranno disposte in provette differenti. Per facilitare la divisione, si possono mettere nella provetta sostanze con peso specifico intermedio tra quello dei globuli rossi e il siero.

-- Per quello che riguarda le *indagini sul plasma*, occorre lasciare sedimentare spontaneamente gli eritrociti che si depositeranno sul fondo della provetta; oppure, centrifugare a 3000 rpm per un tempo di circa 5 minuti e successivamente dividere la parte liquida da quella corpuscolata.

Una volta avvenuta la sieratura e la centrifugazione, il campione viene smistato nei settori analitici di pertinenza (può avvenire anche all'interno dello stesso laboratorio). Su uno stesso campione si possono effettuare diverse analisi. Terminato lo smistamento dei campioni si procede con la fase analitica vera e propria, ossia l'esecuzione dell'analisi.

La conservazione è importante in quanto:

- Può accadere che sullo stesso campione si debba dosare nuovamente la stessa sostanza; ad esempio, perché il medico non è convinto del risultato ottenuto da quel campione.
- La conservazione del campione permette il dosaggio di ulteriori analiti sulla base dei risultati ottenuti in partenza.
- In molti casi il campione viene conservato anche per il dosaggio di ormoni o di alcuni marcatori non vengono richiesti frequentemente; in quest'ultimo caso si possono raccogliere più campioni sui quali si effettua insieme il dosaggio dello specifico analita.

È compito del laboratorista visionare questi valori così che egli stesso possa consigliare eventuali dosaggi di ulteriori analiti sullo stesso campione. Oggi esistono i test reflex come:

- Il **TSH reflex**; consiste nel dosaggio del TSH. Sulla base del risultato ottenuto si può decidere se analizzare o meno la frazione libera dell'ormone tiroideo FT4 o eventualmente di anticorpi (questo approccio riduce anche la spesa economica).
- Il **TSA reflex**; consiste in un test che volto a monitorare il valore del TSA (marcatore per eccellenza del carcinoma prostatico). Sulla base del TSA totale, si può richiedere l'analisi per valutare la concentrazione del TSA libero.

CAUSE PRINCIPALI DI ALTERAZIONE DEL CAMPIONE

- Evaporazione. - Fenomeni di adsorbimento o desorbimento dei materiali utilizzati per il prelievo.
- Solubilità. - Effetto della luce che può alterare le sostane contenute nel materiale biologico.
- Decomposizione microbica se il campione non è mantenuto a temperatura idonea. - Metabolismo delle cellule del sangue. - Una serie di reazioni chimiche.

CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE DI SANGUE VENOSO: Dopo il dosaggio dell'analita, il campione deve essere conservato per un periodo di tempo limite di 2-3 giorni e un tempo massimo di 7 giorni, sempre a 4°C. Se il campione dovesse essere conservato per tempi più lunghi, quest'ultimo dovrà essere congelato a -20°C o -80°C. Il metodo migliore per conservarlo è quello di alipotarlo in piccole provette, creando così **alipote**; l'utilità risiede nel fatto che quando il campione dovrà essere utilizzato non lo si dovrà scongelare interamente. Per la conservazione del campione si può quindi optare per: - La costituzione di alipote. - L'immersione in azoto liquido. - La conservazione a -80°C (i metodi di congelamento sono consigliati nella ricerca nel suo complesso).

I fattori che definiscono l'**attendibilità analitica del dato** sono: **Sensibilità; Specificità; Accuratezza; Precisione**. I primi due fattori dipendono fortemente dal metodo utilizzato; i secondi due dipendono, invece: **Dall'esecuzione; Dall'efficienza dello strumento; Dall'operatore**.

VARIABILITÀ ANALITICA TOTALE: La variabilità analitica totale è data dall'insieme di tutti gli eventi che si possono verificare nelle fasi costituenti il *ciclo analitico*, e dunque: - Fase Pre-analitica - Fase Analitica - Fase Post-analitica

• **Fase Analitica:** Consiste nell'esecuzione dell'analisi, in particolare nel dosaggio dell'analita o genericamente di una particolare sostanza. Questa fase si fonda sull'**attendibilità analitica**: qualità che caratterizza un metodo o un risultato analitico. I criteri determinanti che definiscono l'attendibilità di un metodo analitico sono rappresentati da:

La **Sensibilità** di un metodo è rappresentata dalla più piccola quantità di sostanza che si riesce a dosare, cioè a distinguere sicuramente dal valore zero. Dunque, un metodo è tanto più sensibile quanto più riesce a dosare la più piccola quantità di sostanza (analita) presente nel campione. *Il valore di tale grandezza minima prende il nome di **limite di rivelazione** ed è strettamente correlato con la precisione del metodo. Naturalmente un metodo è migliore di un altro se, a parità di condizioni, è più sensibile.*

La **Specificità** di un metodo è la proprietà per cui esso è in grado di misurare unicamente la grandezza per la quale è specificamente impiegato. Si dice che un metodo è specifico quando non subisce interferenze da parte di altre sostanze e, di conseguenza, non ci saranno falsi positivi o falsi negativi. I metodi utilizzati nei laboratori di chimica clinica e patologia clinica (in generale anche negli altri laboratori) sono testati e sottoposti a controlli di qualità, presentano perciò elevata **sensibilità e specificità**.

La **Precisione** di un metodo è la sua capacità di fornire valori concordanti quando utilizzati ripetutamente per l'analisi dello stesso campione. Un metodo è preciso quando i risultati sono distribuiti molto vicini al valore medio. Quanto più i risultati di analisi ripetute coincidono, tanto più il metodo è preciso.

Il concetto di precisione include quello di **Ripetibilità e Riproducibilità**.

- **Ripetibilità:** misura della deviazione dei risultati dal valore medio, ottenuta da un tecnico in una serie analitica senza cambiare reattivi o apparecchi. Un metodo è tanto più ripetibile quanto più si ottengono dati molto concordanti tra loro a seguito di ripetizioni.
- **Riproducibilità:** misura della deviazione dei risultati dal valore medio, ottenuta nel corso di più settimane o mesi, da tecnici diversi che non conoscono l'identità del campione analizzato e che, per effettuare l'analisi, usano lotti di soluzioni standard, reagenti e apparecchi diversi.

L'**Accuratezza** è la concordanza (o vicinanza) tra il valore ottenuto mediante l'analisi ed il valore "reale" attribuito al parametro analizzato; accuratezza è quindi sinonimo di **correttezza**.

*Nessun test è perfettamente accurato in qualsiasi momento, perciò il problema è definire il **grado di inaccuratezza accettabile**. Per tale motivo la maggior parte dei laboratori utilizzano test con accuratezza >95% (nei laboratori è fondamentale avere **alta accuratezza e precisione**).*

• **Fase Post-analitica:** Consiste nel dare un risultato rispetto al dosaggio effettuato, è quindi necessario stilare un **referto analitico**.

REFERTO ANALITICO: Il risultato delle analisi di chimica clinica deve contenere una serie di informazioni precise riguardo:

- **Sistema:** nome e cognome del paziente.
- **Sottosistema:** il tipo di campione su cui è stata effettuata l'analisi (sangue, urina, feci, ecc.).
- **Componente:** l'analita/sostanza utilizzata (colesterolo, glucosio, creatinina, ecc.).
- **Unità di misura:** possono essere utilizzate unità di misura differenti.
- **Valore numerico del risultato:** ottenuto nella fase analitica.
- **Valori di riferimento.**

Il referto analitico è costituito da:

- Identificazione del campione (*esami ematochimici*)
- Esame eseguito e dato analitico (*glucosio, colesterolo, trigliceridi, creatinina...*)
- Valori di riferimento (*glucosio: 60- 100, con unità di misura: mg/dl*)
- Metodo utilizzato (*Nel caso del glucosio: Metodo enzimatico*)

INTERPRETAZIONE CLINICA DEI RISULTATI: Uno dei problemi principali della Fase Post-analitica è l'*interpretazione dei risultati*. È necessario distinguere i valori considerati “normali” e i valori considerati “alterati”.

Valori normali: Per anni si sono considerati come “valori normali” una certa porzione, definita statisticamente significativa (in genere il 95%) dai valori ottenuti in un gruppo di persone geneticamente considerate sane. È però più corretto parlare di *valori di riferimento*.

- **Esempio:** L'Emoglobina ha valori di riferimento differenti nel sesso femminile e nel sesso maschile, poiché nell'ultimo caso il *testosterone* agisce sull'*eritropoietina* stimolando la produzione di globuli rossi e la sintesi di emoglobina. *Maschi adulti: 14-18 g/dl. Donne adulte: 12-16 g/dl.*

- **Esempio:** Misurando la *fosfatasi alcalina* in un soggetto adolescente si otterranno valori elevati; in età avanzata tende ad essere ridotto. *Da 10 a 15 anni: da 130 a 700 U/L. Adulti: 50 a 220 U/L.*

Valori di riferimento: Il termine “valori di riferimento”, per propria caratteristica, implica la necessità di dover comparare i valori ottenuti dal paziente ad un gruppo di valori analogo per caratteristiche (cioè da soggetti simili per età, sesso, razza, abitudini di vita, estrazione sociale, ecc.). Esiste una metodica per calcolare i valori di riferimento, poiché sono diversi i fattori che possono influenzare il valore dell'analita.

FATTORI CHE INFLUENZANO I VALORI DI RIFERIMENTO: I principali fattori che influenzano i valori di riferimento sono:

- **Fattore Genetico:** gruppi sanguigni, antigeni di istocompatibilità.
- **Fattore Fisiologico:** età, sesso, razza, peso, ora - giorno - modalità del prelievo, postura, stato nutrizionale, massa muscolare.
- **Fattore esogeno:** alimentazione, attività fisica, fumo che influenza molti marcatori tumorali, alcool, caffè, stress, altitudine, clima, assunzione di farmaci e droghe.
- **Variabilità intra ed interindividuale:** ossia la *variabilità biologica* della specie.
- **Variabilità biologica ritmica:** oscillazioni dei valori di alcuni analiti nel corso della giornata, della settimana, del mese.

COME OTTENERE I VALORI DI RIFERIMENTO: è indispensabile procedere per fasi:

1. Si **seleziona** un campione di una popolazione presentante determinate caratteristiche.
2. Ogni membro di tale popolazione viene sottoposto alla **raccolta del campione**, trattato nella maniera usuale di *raccolta, conservazione e trasporto*.
3. Sui campioni ottenuti vengono **determinati l'analita** o gli analiti che interessano (sulla popolazione si possono individuare diversi valori di riferimento).
4. Utilizzando **metodiche statistiche e matematiche** i dati vengono elaborati in modo da definire un **intervallo di riferimento (95%)**.

È l'intervallo di riferimento ad essere utilizzato come intervallo limite, ossia per individuare il valore di riferimento.

VALORI DI RIFERIMENTO

Individuo di riferimento: Il soggetto è selezionato sulla base di criteri ben definiti (es: solo sesso femminile, caucasica, con specifico range d'età, ecc.). È solitamente definito lo stato di salute della persona. Tuttavia, le caratteristiche del gruppo di soggetti di riferimento necessari dipendono dallo scopo per il quale noi creiamo l'intervallo di riferimento. Selezionando più individui di riferimento, si otterrà una definizione della popolazione di riferimento; da questa, si individuerà poi il *gruppo campione di riferimento*.

Gruppo campione di riferimento: Un numero adeguato di persone viene selezionato dalla popolazione di riferimento (standard: 120 soggetti). A questo punto, tramite diverse metodiche, si definisce l'*intervallo di riferimento*. Per stabilire l'intervallo di riferimento è opportuno tener conto di precisi criteri:

Criteri di esclusione: - Alcolismo; Malattia recente; Allattamento; Obesità, tossicodipendenza; Fumo; Trasfusioni e donazioni di sangue recenti; Terapie farmacologiche croniche

Criteri di ripartizione: - Etnia; Età; Sesso; Fase del ciclo mestruale; Settimana di gravidanza; Fumo; Esercizio fisico

**il fumo può rientrare in entrambi i criteri a seconda della sua utilità.*

Per poter stabilire quali siano i limiti che definiscono la *normalità* si effettuano numerose determinazioni su diverse persone sane e si riportano i risultati su un **grafico di distribuzione**.

I valori riportati sul referto di laboratorio, ottenuti da soggetti della popolazione presa in campione, rappresentano, di norma, il 95% centrale di tali valori. Il calcolo dell'intervallo di riferimento (95%) può essere effettuato mediante due diversi approcci:

• **Calcolo parametrico.**

I valori misurati sono distribuiti quasi *simmetricamente* a destra e a sinistra rispetto al valore centrale, ossia seguono la curva gaussiana. Se la distribuzione riporta questa curva, il 95% della popolazione è individuato in base alla seguente formula: **Media \pm 1,96 SD**

Per “media” si intende la media di tutti i valori ottenuti. Nel grafico si eliminano le due code (all'estrema destra e all'estrema sinistra), che rappresentano in totale il 5% (2,5% ciascuno), ottenendo così l'intervallo di valori di riferimento che costituisce il restante **95%**.

• **Non parametrico.**

- Non fa assunzioni rispetto all'ipotetica distribuzione dei valori risultati da soggetti facenti parte della popolazione di riferimento.

- I valori sono disposti in ordine crescente e poi decrescente (*nell'esempio c'è la sequenza ordinata in ordine crescente che va da 1 a 9, poi in ordine decrescente che va da 109 a 120*).

- A questo punto si calcolano i valori dei percentili ai due estremi, ossia al **2,5** e **97,5** percentile.

I **percentili** sono quegli elementi che dividono una distribuzione ordinata in parti uguali, ciascuna delle quali contiene l'x per cento della distribuzione (*il 2,5 percentile corrisponde al valore 33, mentre il 97,5 percentile corrisponde al valore 984*).

- I valori considerati come “valori di riferimento”, sono quelli compresi tra questi due percentili e rappresentano l'intervallo centrale, del 95%, di tutti i valori ottenuti.

A differenza dell'approccio parametrico, non si usa la media ma la **mediana** del valore ottenuto, che corrisponde a quel valore che divide la distribuzione al 50% (che costituisce quindi il 50° percentile).

INTERPRETAZIONE DEL DATO DI LABORATORIO: Il risultato ottenuto dall'analisi degli analiti varia a seconda della storia clinica del paziente e a seconda che si abbia a che fare con un solo referto o con più referti (nell'ultimo caso si potrà effettuare una *valutazione dinamica* delle condizioni cliniche del paziente).

Un solo referto:

- Confronto tra valori diversi, utilizzando criteri oggettivi (sensibilità, accuratezza, ecc.).

- Bilancio iniziale prima del trattamento.

- Valore soglia.

L'interpretazione su un solo referto risulta utile quando si vuole un *risultato netto*.

Esempio: Test di gravidanza (positivo o negativo), valutazione di un marcatore tumorale prima di iniziare un eventuale trattamento, primo controllo della glicemia per capire se il paziente è diabetico.

Più referti successivi:

- Valutazioni di tipo dinamico.

- Livelli decisionali.

L'interpretazione di più referti invece risulta utile quando è necessario valutare un dato rispetto a situazioni precedenti; poiché, il dato non viene considerato positivo o negativo rispetto ad un valore soglia, bensì positivo o negativo rispetto ad un valore ottenuto in precedenza.

*Esempio: Paziente con **Emoglobina glicata** (HbA1c) superiore ai valori soglia, ma con valore ridotto rispetto a quella presente nel referto precedente. In questo caso il risultato viene interpretato in modo positivo, poiché l'emoglobina glicata è migliorata, sebbene sia ancora superiore al valore soglia.*

I valori ottenuti dal dosaggio di analiti devono essere *validati* dal Dirigente Biologo, il quale è in grado di reputare il valore come attendibile o richiederne la ripetizione; solo una volta che i valori saranno reputati attendibili potranno essere validati e firmati dal Dirigente Biologo.

Negli esami di laboratorio devono essere in particolar modo considerati i **valori critici**, ossia quei valori fuori dai limiti di riferimento a livelli tali da indicare una condizione potenzialmente pericolosa per il paziente e, che richiedono un'**immediata considerazione** da parte del clinico.

I valori critici sono fissati in accordo alle evidenze cliniche e alla letteratura internazionale, anche se ogni laboratorio segue una propria politica di comportamento. *I valori critici devono essere comunicati nell'immediatezza.*

Sono considerati valori critici:

- L'**emocromo**, in particolare il valore dell'**emoglobina** (se <6 si procede con la trasfusione). Questo dato è spesso soggetto a errori; se il sangue nella provetta coagula può riportare valori errati.
- La **formula leucocitaria**; il Dirigente Biologo può decidere se effettuare uno striscio di sangue periferico per analizzare direttamente la morfologia della componente corpuscolata.
- L'esame della **creatinina**: se risulta molto elevata si rende necessaria la dialisi in urgenza.
- Il valore della **glicemia** che supera ampiamente i valori soglia è considerato un valore critico, poiché può portare a coma iperglicemico o ipoglicemico.
- Il valore del **potassio**; è fondamentale in quanto valori fuori dalla soglia mettono a rischio la vita del paziente. È importante ricordare che, spesso, l'**iperpotassiemia** è conseguenza di un campione emolitico; quindi, la prima cosa da fare è controllare che il campione non abbia subito alterazioni. *Tutti gli elettroliti devono essere controllati attentamente.*
- I **marcatori cardiaci**; sono considerati valori critici poiché sono indice di **infarto miocardico**, sul quale si interviene tempestivamente.

ERRORE IN LABORATORIO: Con il termine “errore” si indica la differenza tra il valore ottenuto e il valore “vero”: si definisce così l'*errore totale*, spesso dovuto al sommarsi di diversi errori di varia natura. Nonostante i controlli di qualità interni ed esterni, è inevitabile la presenza di errori all'interno di un laboratorio. Gli errori di misura relativi alla diagnostica di laboratorio si distinguono in:
Errori preanalitici. - Errori analitici. - Errori post-analitici.

Generalmente gli errori sono divisi in tre principali categorie:

1. Errori grossolani: si prevencono con una buona organizzazione e controllo del laboratorio.

Esempi: Scorretta identificazione del campione - cambio di campioni - Prelievo scorretto, conservazione inadeguata - Sbagli di esecuzione, lettura e calcolo - Trascrizione e attribuzione dei risultati scorretti.

2. Errori sistematici: possono essere individuati ed opportunamente controllati.

Esempi: Errato titolo delle soluzioni di riferimento (errore di pesata, impurezza dei materiali, decadimento). - Errore nella taratura di strumenti (scale lunghezza d'onda, pipette, dosatori). o Aspecificità dei procedimenti analitici. - Errori personali ed operativi (scelta sistema di lunghezza d'onda non corretta, introduzione di fattori d'errore nei calcoli, lettura errata sistematica di strumenti). Anche in questo caso è possibile evitarli se i controlli di qualità vengono eseguiti frequentemente.

3. Errori accidentali o casuali: non è semplice individuarli e controllati.

Esempi: Scarsa correttezza nell'esecuzione: quando si effettua il controllo di qualità è importante controllare che l'analisi venga effettuata in maniera corretta, sia controllando gli operatori sia la correttezza nell'esecuzione vera e propria. - Inadeguatezza ambientale (polveri, rumori, aumento della temperatura, scarsa illuminazione). - Instabilità nell'alimentazione elettrica (si tratta di alterazioni minimali che non vengono percepite dall'operatore ma che possono alterare la macchina e di conseguenza il risultato).

ERRORI PREANALITICI: Gli errori preanalitici riguardano tutti gli eventi che caratterizzano la *Fase Pre-analitica*, dalla preparazione del paziente, alla raccolta del campione, alla conservazione e alla manipolazione corretta del campione.

Tali errori sono essenzialmente legati a due fattori:

1. La **variabilità biologica** propria dell'individuo o degli individui di una popolazione; infatti, la variabilità biologica comprende:
 - La *variabilità intraindividuale*: ampiezza delle oscillazioni intorno ad un proprio punto di equilibrio omeostatico.
 - La *variabilità interindividuale*: differenza tra i punti omeostatici in diversi individui appartenenti alla stessa popolazione (Ad esempio: Donne della stessa età, con caratteristiche simili avranno sempre una certa varietà interindividuale).
2. La **metodologia di preparazione del paziente** all'esame, la raccolta, l'identificazione, la conservazione e il trasporto del campione.

VARIABILITÀ BIOLOGICA: La concentrazione di un componente qualsiasi in ciascun individuo non rappresenta un parametro fisso, bensì il risultato di un ***equilibrio dinamico*** determinato dal bilanciamento tra ingresso e uscita, dal torrente circolatorio, di quel componente. Il valore di concentrazione all'equilibrio viene denominato ***punto omeostatico*** e, tale variabilità casuale prende il nome di ***variabilità biologica intraindividuale***. Esiste anche una ***variabilità biologica interindividuale***, cioè una variabilità tra individui diversi. Esistono alcune condizioni che devono essere prese in considerazione come variabilità biologiche in quanto influenzano fortemente il dato dell'analita, in particolare:

- Ritmi circadiani (soprattutto negli ormoni, in particolare il ***cortisolo***); Ciclo mestruale; Variazioni stagionali; Età; Dieta; Gravidanza; Sesso; Gruppo etnico; Massa corporea; Tipo di attività lavorativa.; Localizzazione geografica; Fumo di tabacco; Ingestione recente di cibo; Postura; Disturbi del sonno, stati d'ansia; Affaticamento fisico; Immobilizzazione forzata.

Esempio: Il *cortisolo* è soggetto ad una secrezione basale pressoché costante nelle 24 ore, con picco massimo (acrofase) registrato intorno alle primissime ore del mattino (3-4) e picco minimo che coincide con le prime ore di riposo notturno (22-24). La concentrazione plasmatica del *GH* o somatotropina raggiunge la propria acrofase intorno alle 24 e fa registrare i suoi valori minimi dalle 8 alle 20.

Per questo motivo è fondamentale conoscere la variazione degli ormoni durante il ritmo circadiano.

Secondo Esempio: Durante le varie fasi del ciclo mestruale sono osservabili importanti variazioni di ormoni, quali l'*estradiolo*, il *progesterone*, l'*LH* e l'*FSH*. In base all'esame richiesto, sarà necessario aspettare determinati giorni per poter effettuare le analisi.

ERRORI ANALITICI: Gli errori analitici sono quelli commessi in laboratorio e possono essere:

- ***Errore grossolano:*** "sbaglio" che può essere prevenuto da provvedimenti organizzativi.
- ***Errore casuale:*** responsabile dell'imprecisione analitica (dell'efficienza analitica del laboratorio). Riducibile ma non eliminabile completamente; si cerca di tenerlo sotto controllo attraverso il Controllo di Qualità Interno (al laboratorio).
- ***Errore sistematico:*** responsabile dell'inaccuratezza analitica (metodo), determina una sovrastima o sottostima dei risultati ottenuti rispetto a quelli attesi. Sorvegliato attraverso il controllo di qualità interno ed esterno.

ERRORI POST-ANALITICI: Gli errori post-analitici sono legati a: Errata attribuzione di un referto ad un paziente - Ritardi nella consegna dei risultati - Errori di trascrizione dei risultati nella cartella clinica - Eventuali interpretazioni errate o insufficienti dei risultati delle misure in laboratorio

APPROCCIO EVIDENCE BASED: ***Evidence Based Medicine*** (EBM= Medicina Basata sull'Evidenza): scelta delle migliori esperienze scientifiche su cui basare la clinica e la valutazione dei risultati ottenuti. Questo approccio è applicabile anche al Laboratorio, in quanto ci sono metodi che vengono cambiati e migliorati sulla base delle evidenze scientifiche.

L'approccio evidence based si basa su tre settori complementari di intervento:

1. Revisione sistematica della letteratura medica per la scelta degli studi più rigorosi e significativi nei settori prescelti.
2. Tale evidenza scientifica diventa la base dell'azione medica, codificata in singoli trattamenti, linee guida, algoritmi diagnostici etc.
3. Questi schemi formali di azione vengono sottoposti a revisione continua attraverso la valutazione rigorosa del risultato (clinico, scientifico, gestionale, etc.).

Uno schema molto usato che si adatta alla EBM applicata al laboratorio è lo schema logico **PICO** (*Patient, Intervention, Comparator, Outcome*), che consente di sviluppare quesiti strutturati e di valutarne e monitorarne gli effetti sul processo clinico.

Patient Paziente o popolazione oggetto del quesito strutturato

Intervention Test diagnostico usato

Comparison Test che costituisce lo standard di riferimento

Outcome Risultato della comparazione, ovvero della decisione clinica presa sulla base del test.

INTERFACCIA CLINICA: Il flusso delle informazioni tra clinica-laboratorio attiene tutto il ciclo analitico ed è necessario che ci sia un'interfaccia continua.

Reflexive testing: è scelto dopo interfaccia laboratorio-clinica, consiste nella decisione di effettuare il dosaggio di ulteriori analiti su uno stesso campione per approfondire la diagnosi. Deve essere differenziato dal *Reflex Test*, che è già stato codificato e approvato (ad esempio TSH reflex).

Quando viene effettuato l'emocromo è bene evidenziare il profilo sierico delle proteine. Il profilo sieroproteico ha grande *attendibilità* e *validità* nella patologia clinica.

LE PROTEINE PLASMATICHE: Le proteine plasmatiche sono delle macromolecole presentanti numerose funzioni e dal ruolo essenziale nella nostra nutrizione. La loro struttura è caratterizzata da una sequenza di amminoacidi (uniti mediante *legame peptidico*), ognuno dei quali presenta un gruppo amminico e un gruppo carbossilico. *La sequenza amminoacidica è specifica per ogni proteina.* Alcuni amminoacidi risultano importanti anche per la *configurazione* e il *ripiegamento* della molecola proteica; infatti, alcuni amminoacidi presentano dei *gruppi sulfidrilici* (come nel caso della **prolina** e della **cisteina**). I gruppi SH interagiscono tra loro facendo così assumere alla proteina una conformazione spaziale differente. Molte proteine, in particolar modo quelle di tipo enzimatico, presentano dei **siti funzionali** o **siti catalitici** fondamentali per la funzione stessa della proteina. Spesso la proteina nasce con una certa lunghezza per poi essere privata di alcuni amminoacidi privi di una vera e propria attività funzionale; perciò, si ottiene una molecola finale secreta più piccola di quella di partenza.

Si verificano, quindi, delle *modificazioni funzionali*: la proteina può ricevere dei *residui glicidici* (zuccheri, carboidrati) oppure dei *residui lipidici*.

Le proteine plasmatiche ammontano a circa 6-8 gr/dl e sono costituite da una miscelanza di specie molecolari di diversa natura chimica, origine (vengono, infatti, prodotte da diversi tipi cellulari, ma soprattutto nel *fegato*) e funzione (in base alla presenza di catene glicidiche o meno hanno diverse funzioni). Si possono trovare come proteine semplici oppure sotto forma di proteine coniugate:

- Le **proteine semplici** sono costituite da una serie di amminoacidi che raggomitolandosi tra loro danno luogo a una sequenza tale da rendere compatta la struttura della proteina stessa.
- All'interno delle **proteine coniugate** sono presenti gran parte degli zuccheri, e a seconda della quantità dei residui carboidratici queste proteine assumono diversa funzione.

Nel circolo ematico viaggia una grande quantità di proteine plasmatiche. Le proteine della coagulazione sono anche proteine plasmatiche. Quando parliamo di proteine plasmatiche intendiamo infatti anche le proteine della coagulazione, le quali possono viaggiare nel torrente ematico in forma inattiva (si attiveranno in caso di necessità) oppure in forma già attivata (il *fibrinogeno* viaggia in maniera inattiva).

RICORDA: Il siero si ricava dal sangue per sedimentazione una volta che è avvenuta la coagulazione. Le proteine fanno parte del precipitato, cioè il coagulo; quindi, non possono essere presenti nel siero.

DESTINAZIONE FINALE DI UNA PROTEINA: A seconda che la proteina sintetizzata sia destinata a rimanere in cellula o a essere secreta nel torrente ematico, viene indirizzata dalle **molecole segnale** verso siti quali: la membrana plasmatica, la membrana nucleare, il mitocondrio oppure il citoplasma. Generalmente,

quando le proteine non presentano i *peptidi segnale*, vengono immesse nel circolo ematico. Giunta a destinazione finale (qualunque essa sia, che finisca in soluzione acquosa o che si adagi ad una membrana), la proteina va incontro a modifiche che la portano a ripiegarsi (***folding***, come nel caso delle proteine di membrana). Nel caso di una lipoproteina di membrana, gli aminoacidi idrofobici sono presenti all'interno delle membrane biologiche mentre gli aminoacidi idrofilici si trovano rivolti verso l'esterno o verso l'interno della cellula stessa.

PROTEINE: SUDDIVISIONE IN CLASSI

Lipoproteine: hanno legati alla loro struttura proteica dei residui lipidici

- **Glicoproteine:** contengono dei gruppi carboidratici.
- **Fosfoproteine:** contengono dei gruppi fosfato.
- **Flavoproteine:** proteine legate a dei gruppi flavinici.
- **Metallo-proteine:** proteine che legano i metalli.

Sono importanti nei processi di *chelazione* (legano metalli come il ferro). Le metalloproteine sono importanti nei processi di intossicazione; sono, infatti, costituenti delle terapie utili a rendere non funzionali i metalli. L'attività delle metallo-proteine è quella di avvolgere il metallo per evitare che esso reagisca.

Le proteine possono essere inoltre distinte in base alla forma:

- Le **proteine globulari** si raggomitolano su loro stesse per avere una struttura compatta. In particolare, sono proprio le catene amminoacidiche a raggomitolarsi per formare tale tipo di struttura. Questo tipo di proteine presenta diversi tipi di struttura secondaria e sono solubili in acqua. Tra le proteine globulari si rintracciano gli *enzimi*, proteine di trasporto come l'*albumina* e le immunoglobuline.
- Le **proteine fibrose** non sono solubili in acqua e contribuiscono alla formazione di diverse strutture cellulari, tra queste troviamo: *cheratine* (presenti nei tessuti protettivi), il *collagene* (presente in tutto l'organismo) e le proteine della seta.

PERCHE' LE PROTEINE PLASMATICHE SONO IMPORTANTI? Le proteine plasmatiche sono degli indicatori molto importanti della funzionalità degli organi, in quanto, alterazioni delle loro frazioni danno informazioni su eventuali patologie e permettono anche di seguire l'evoluzione stessa di una malattia. Ci sono, infatti, delle proteine che rappresentano degli indicatori per le risposte flogistiche (risposte infiammatorie). Se una proteina, che è *marker* di una risposta flogistica, aumenta, vuol dire che l'infiammazione sta aumentando. Questo serve inoltre per valutare se una terapia farmacologica è utile nel contrastare una risposta infiammatoria, poiché alla terapia dovrebbe corrispondere una diminuzione delle proteine che aumentano durante l'infiammazione.

LE PROTEINE PRESENTI TRANSITORIAMENTE: Alcune proteine sono presenti nel plasma soltanto in maniera transitoria. Si tratta di proteine che hanno una emivita relativamente bassa in quanto escono dal torrente ematico e vanno incontro a diversi destini:

- Molte di esse vengono captate dai tessuti e quindi fagocitate dalle cellule.
- Altre, invece, sono dei messaggeri ormonali che transitano nel plasma (vengono secrete dalle cellule endocrine) e il loro destino è quello di condizionare l'attività delle cellule e dei tessuti dei vari organi.
- Anche i prodotti della citolisi sono inclusi tra le proteine che hanno un'emivita breve. (Tra di esse troviamo le **transaminasi** prodotte dal fegato. Un eccesso di transaminasi indica che il fegato non è in buona salute. Infatti, il compartimento plasmatico si arricchisce di queste proteine solo quando il fegato è rovinato, cioè quando gli epatociti hanno la membrana plasmatica lesionata (l'epatocita sta quindi andando incontro a citolisi). Gli enzimi, quindi, non vengono trattenuti dalle cellule e passano direttamente nel sangue. Questo vale anche nel caso di una fibrilla del muscolo cardiaco che, se va incontro a lisi, libera enzimi nel circolo sanguigno. Questi ultimi sono indice del malfunzionamento della cellula che le ha prodotte e soprattutto sono indice di un infarto al miocardio. Quindi alcuni enzimi prodotti sono marker di citolisi e in alte concentrazioni, nel circolo ematico, potrebbero essere indice di un malfunzionamento di un tessuto.
- Possono essere dei segnali ormonali.

- Alcuni sono considerati costitutivi della componente proteica del plasma e per questo motivo vengono definite **plasmaproteine** (risiedono al livello plasmatico).

PLASMAPROTEINE: Le plasmaproteine sono prodotte per l'80% dal *fegato*. Le immunoglobuline (anticorpi) vengono prodotte a partire dai *linfociti B* che si differenziano in plasmacellule. Una quantità di plasmaproteine più bassa viene prodotta da altre cellule: *cellule mesenchimali* e *monociti/macrofagi*. Le plasmaproteine vengono successivamente rimosse: Nel *fegato*, prevalentemente - Nelle *cellule reticoloendoteliali* - Nelle *cellule glomerulari*.

LE PROTEINE HANNO DIVERSE FUNZIONI:

- Alcune proteine hanno una **funzione nutritiva**, come l'*albumina* (ma non solo).
- Altre proteine hanno una **funzione tampone**, l'*emoglobina* ne è l'esempio. Queste proteine fanno sì che spostamenti del nostro pH siano di piccola entità; quindi, fanno sì che il pH si mantenga a 7.4.
- Ci sono poi proteine che fanno parte del fenomeno della coagulazione e della fibrinolisi, alcune di queste viaggiano già attive nel torrente ematico e altre, invece, vengono attivate proprio durante il processo della **coagulazione**.
- Alcune proteine sono dei **fattori di difesa**, come le *proteine del complemento* e altre *proteine del sistema immunitario* necessarie per difendere l'organismo dai patogeni.
- Altre proteine hanno una **funzione di trasporto**. Un esempio è l'*albumina* (forma legami in maniera aspecifica) che funge da trasportatore di molti messaggeri o ormoni. Il legame tra la molecola e la proteina di trasporto è necessario anche per allungare la vita media del messaggero stesso, che altrimenti verrebbe subito catabolizzato.
- Esistono proteine che servono per il **mantenimento** della pressione ematica, o meglio della **pressione colloidosmotica**. Anche in questo caso la proteina che mantiene questa pressione è l'*albumina*.
- Altre proteine sono, invece, importanti per **monitorare lo stato infiammatorio** (*PCR*, *Alfa-1-tripsina* e *Alfa-1-glicoproteina-acida*, sono le proteine da attenzionare in uno stato flogistico e per valutare la terapia farmacologica, così da stabilire se risulta efficace o meno). È importante dare uno sguardo di insieme a queste proteine e non valutarle singolarmente.

CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DELLE PLASMAPROTEINE: Alcune proteine vengono separate con il metodo elettroforetico e quindi assumono una forma tipica di un **quadro sieroproteico** con vari picchi. Il primo picco è quello dell'*albumina*, segue l'*Alfa-1-globulina*, l'*Alfa-2-globulina*, le *Beta-globuline* e infine le *Gamma-globuline*. Queste proteine hanno nel nome una lettera greca in base alla posizione all'interno del quadro elettroforetico; infatti, le gamma globuline sono chiamate così perché occupano la quarta posizione nel quadro (escludendo il primo picco che è quello dell'*albumina*).

LA PREALBUMINA: La prealbumina compare prima del picco dell'*albumina* ed è una proteina che ha una maggiore mobilità elettroforetica rispetto all'*albumina*. Questa proteina lega sia il **retinolo** (precursore della vitamina A) che la **tiroxina**. Anche questa proteina è un trasportatore e ha un range di concentrazione di 0,2-0,4 gr/L e un PM di 55kDa. La sintesi delle proteine varia con l'età, infatti, tende a diminuire anche per l'affaticamento generalizzato in età senile. **NB:** molte proteine vengono prodotte dal *fegato* e nel soggetto anziano spesso il *fegato* non è perfettamente funzionante come nel giovane e nell'adulto. La prealbumina serve come trasportatore di *amminoacidi*, *vitamine*, *ormoni* e quindi, in generale, di *sostanze nutritive*. Esiste una forma di prealbumina di derivazione cerebrale, a livello dei ventricoli cerebrali, dove serve per il trasporto di sostanze nutritive o ormoni al cervello, superando la barriera emato-encefalica. La sintesi della prealbumina è dipendente dalla **biodisponibilità di amminoacidi**; infatti, l'organismo sintetizza proteine a partire da amminoacidi solo se ha l'energia necessaria per la sintesi. In condizioni infiammatorie rilevanti con aumentata perdita di proteine e affaticamento muscolare (proteolisi muscolare, quando c'è, ad esempio, uno stato di debolezza del tono muscolare) la produzione di prealbumina è ridotta dagli **stimoli citochinici** (si tratta di citochine pro- infiammatorie). Alcune plasmaproteine servono per andare a monitorare lo stato flogistico, alcune di queste, infatti, aumentano e per questo motivo vengono dette "**proteine da flogosi positive**", altre invece diminuiscono nella loro concentrazione, quindi vengono dette "**proteine negative**". Alcune citochine prodotte durante lo stimolo proteolitico causano una riduzione di queste proteine che quindi in corso di flogosi diminuiscono. La diminuzione di queste proteine può avvenire anche in caso di:

Denutrizione - Patologie epatobiliari - Stati infiammatori. Un eccesso di prealbumina può portare ad uno stato di *amidoilosi*, con conseguente aumento della *proteina sieromieloide*.

L'ALBUMINA: È una delle proteine maggiormente presenti nel sangue.

- Ha una concentrazione di 32 gr/L. - PM di 69kDa. - Si conoscono più varianti geniche.
- È priva di carboidrati, infatti non è una glicoproteina. Ha una forma globulare.
- Rappresenta il 60% della produzione totale di proteine epatica.
- Non viaggia da sola, ma viaggia idratata. Quando si sposta, porta con sé una nuvola d'acqua.

Se dal sangue si sposta nel compartimento extravascolare, quindi nei tessuti, porta con sé anche la componente acquosa, infatti si lega fortemente all'acqua che segue la proteina. Si verifica il fenomeno dell'extravasazione, quindi la componente liquida del sangue giunge anche nell'interstizio, in alcuni casi provoca quindi l'edema. L'albumina, quindi, controlla il passaggio dei liquidi ai tessuti e quindi regola la *pressione colloidale*. L'albumina causa un cambiamento della *pressione oncotica* e anche della *pressione arteriosa*.

- È un *trasportatore aspecifico* di molte sostanze (ormoni, calcio, magnesio, bilirubina, farmaci, acidi grassi)
- Non esistono condizioni che stimolano un aumento di sintesi epatica di albumina, il suo aumento di concentrazione è dovuto alla riduzione del volume ematico (come nel caso di shock o disidratazione).
- Diverso è il caso di *ipoalbuminemia*, indicativo di una *ipoproteinemia* cioè il fegato sta sintetizzando meno proteine del dovuto (da sola costituisce 50-64% di proteine plasmatiche totali).
- L'albumina si trova nel primo tratto del quadro sieroproteico.

NB: L'edema è il segno clinico più caratteristico della sindrome nefrosica, una patologia caratterizzata da un difetto nella filtrazione glomerulare e che comporta l'ingresso di eccessi di acqua nei tessuti che, di conseguenza, diventano molli. L'edema si può verificare anche per difetti del ritorno venoso.

Si localizza soprattutto a livello del piede, nell'occhio, nella regione parasacrale e periorbitale.

La differente permeabilità vascolare avviene prevalentemente a livello capillare, dove è presente una struttura molto esile rispetto alla costituzione di un'arteria o una vena, che presentano anche una componente muscolare. La fuoriuscita consistente di acqua generata dall'edema si verifica, infatti, a livello capillare proprio per questo motivo.

LA SINDROME NEFROSICA (ritenzione idrica generata da una disfunzione renale) Caratterizzata da alterazioni della funzionalità renale. La molecola dell'albumina è carica negativamente così come lo è la membrana glomerulare dei reni; quindi, si viene a determinare una reazione di repulsione che evita la filtrazione dell'albumina stessa. Se c'è un'alterazione chimico-fisica delle cariche a livello del glomerulo renale o anche un'alterazione della costituzione dei pori dei capillari renali, ciò determina una maggiore lassità e una maggiore perdita di sostanze che generalmente non dovrebbero passare. Le cause della **Sindrome Nefrosica** sono:

- *Alterata e ridotta distribuzione delle cariche anioniche sulla membrana glomerulare.*
- *Alterazione dei pori per lesioni istologiche* (si parla di proteinuria o ipoalbuminemia che si traducono poi con l'edema).

Nel profilo sieroproteico si ha un abbassamento dell'albuminemia compensatorio per permettere l'aumento delle alpha1, alpha 2 e poi beta globuline.

In alcuni casi di edema, come nell'ipotiroidismo, si verifica anche ipoalbuminemia? Nel caso dell'ipotiroidismo, si verifica un'ostruzione dei pori a livello oculare e si tratta di una reazione infiammatoria localizzata. Ci sono degli stati di ipotiroidismo in cui c'è anche una base autoimmune. Sicuramente si verifica una maggiore permeabilità vascolare, però in quel caso sono gli ormoni tiroidei che comportano l'edema e non l'albumina.

L'albumina viene secreta:

- 25mg/24h è l'escrezione fisiologica attraverso le urine.
- 25-200 mg/24h determina *microalbuminuria* (si verifica anche nel diabete).
- >200 mg/24h determina *proteinuria patologica* (quando c'è una forte alterazione della membrana che comporta il passaggio di proteine dal peso e dalla grandezza molecolare differenti).

Come mai c'è microalbuminuria nel diabete? Perché il diabete è una malattia sistemica. Un semplice incremento del glucosio ematico compromette la funzione di molti organi ed appesantisce anche il rene. Si vengono a formare prodotti metabolici diversi come i corpi chetonici; quindi, si verificano fenomeni di filtrazione particolari che affaticano il rene. Nel caso del diabete, si ha una perdita delle proteine di piccole dimensioni, l'albumina ha un PM di circa 70 kDa; quando è inferiore ai 70kDa si parla di microalbuminuria. Le proteine più basse passano perché c'è una necropatia diabetica; quindi, il rene viene ostacolato nel suo normale filtraggio. Lo stesso glucosio passa perché supera il livello di saturazione (il glucosio, in condizioni fisiologiche, viene filtrato e poi riassorbito), quindi si verifica glicosuria, cioè si trovano nelle urine zuccheri e anche proteine di medio calibro che non dovrebbero passare.

VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE EMATICA DI ALBUMINA: Quando c'è un'alterazione della concentrazione di albumina, non si parla di aumento, ma solo di riduzione. Gli incrementi di albumina sono dovuti prevalentemente da una diminuzione del volume ematico piuttosto che da un aumento di sintesi epatica. Di maggiore rilevanza sono le cause che portano ad un abbassamento della sua concentrazione a livello plasmatico (si parla di **ipoalbuminemia**). L'ipoalbuminemia si può verificare per quattro motivi:

- **Alterazione della permeabilità capillare**, come negli stati infiammatori, a causa delle citochine, del tumor necrosis factor, delle interleuchine, ma soprattutto dei primi messaggeri della flogosi, come l'istamina, che causa una forte permeabilità a livello dei capillari. Questi vasi diventano più lassi e generano una maggiore fuoriuscita di componente liquida nel compartimento interstiziale,
- **Ridotta sintesi** dovuta a fenomeni di deperimento organico, malnutrizione, malassorbimento, un fegato mal funzionante. Tutto ciò determina una riduzione della concentrazione di albumina.
- **L'Iperidratazione**, come in gravidanza e allattamento. Durante la gravidanza aumenta il volume ematico del 33 %, aumenta anche la frequenza cardiaca e la gittata e il numero di eritrociti. Si tratta di stati fisiologici funzionali al fatto che c'è un feto in crescita oltre all'organismo della madre che deve continuare a nutrirsi.
- **Escrezione anomala o degradazione** dovuta alla compromissione renale causati da danni, emorragia e stati di catabolismo per cui si ha una situazione alterata.

LE ALPHA GLOBULINE: Sono proteine che si trovano subito dopo l'albumina nel quadro sieroproteico.

-- Le alpha 1 globuline sono: Alfa 1-antitripsina / Alfa 1-antichimotripsina / Siero amiloide A / Alfa 1-acido glicoproteina / Alfa 1-lipoproteina

-- Le alpha 2 globuline sono: Aptoglobina / Alfa 2 -macroglobulina / Alfa 2 -lipoproteina / Globulina legante gli ormoni tiroidei (TBG) / Ceruloplasmina / Proteina C / Angiotensinogeno

La produzione di queste proteine aumenta durante le fasi di infiammazione, soprattutto le alpha 1 globuline. Aumentano anche: In gravidanza - In caso di malattie infettive - Malattie croniche (ad esempio di tipo infiammatorio) - Nell'infarto del miocardio - In alcune neoplasie - In caso di carenza di *Alpha-1-chimotripsina* (un determinato gene, in questo caso, non codifica) - In una malattia ereditaria, che interessa soprattutto i vasi nei quali si verifica deposito di tessuto collagene, con conseguenti problemi di circolazione - Nella sindrome nefrosica.

ALPHA 1-ANTITRIPSINA: È una *Alpha-1-globulina*. È una glicoproteina che contiene amminoacidi glicosilati (quindi legati a carboidrati). Ha una concentrazione di 0,9-2,3 g/L. Ha un PM di 54kDa. Viene sintetizzata dal **fegato** e dai **monociti/macrofagi**. Si lega in modo preferenziale alla **tripsina**. Ha un'azione biologica rilevante, infatti, oltre ad inibire la tripsina e l'arginina (inibisce, più in generale, gli enzimi proteasi), ha un ruolo importante durante i fenomeni flogistici in cui ci può essere un'aggressione leucocitaria a livello dell'apparato respiratorio. Si ha quindi un'alterazione delle proteasi.

o Ad esempio, a causa di infiammazioni croniche a carico dell'apparato respiratorio si va a determinare una dilatazione degli alveoli, con formazione poi di enfisema (moli dilatate di alveoli). C'è quindi una forte alterazione delle vie respiratorie.

È molto importante l'attività della *Alpha-1-antitripsina* perché va a controllare ed equilibrare l'attività delle proteasi durante i fenomeni flogistici. È in grado di controllare l'attività delle elastasi che è una proteasi responsabile della distruzione del tessuto connettivo. Quindi inibendo l'attività di questa proteasi, protegge così i tessuti sani.

- C'è un aumento della *Alfa-1-antitripsina* nella Sindrome Nefrosica, nelle patologie terminali, nei processi flogistici.
- C'è un decremento della *Alfa-1-antitripsina*, dovuta ad effetti congeniti legati al gene. È un gene polimorfo, infatti, si conoscono 75 forme alleliche differenti, classificate in base a quanto sono funzionanti. Quando ci sono varianti geniche che determinano situazioni carenziali, tra queste forme carenziali, la più grave è quella che riguarda lo stato di omozigosi per l'allele Z.

L'allele Z determina una NON produzione della proteina, quindi si ha una mancanza della produzione della *Alfa-1-antitripsina* e di conseguenza, viene a mancare un'adeguata protezione dall'elastasi neutrofila prodotta in fase infiammatoria.

Per esempio, l'*elastasi granulocitaria* è ampiamente espressa in corso di infiammazione dei bronchi (in caso di bronchiti e malattie bronco-polmonari), in caso di presenza del portatore dell'allele Z, si è quindi più esposti a malattie bronco-polmonari e a deficit funzionali dell'attività respiratoria che comportano una diminuzione progressiva dell'attività alveolare e conseguente enfisema.

ALPHA-1-FETOPROTEINA: Ha un valore prognostico soprattutto per le malattie oncologiche. È presente solo nel periodo fetale nei tessuti e nel plasma e la sua concentrazione diminuisce dopo la nascita. Si verifica un aumento progressivo durante la gravidanza. Una presenza di questa proteina successiva al periodo fetale potrebbe essere indice di malattie neoplastiche. Quindi monitorare la sua concentrazione è utile anche per valutare eventuali terapie antineoplastiche. Se c'è, infatti, una diminuzione di questa proteina in seguito a terapia, significa che c'è anche una regressione del tumore. La proteina viene prodotta in corso di tumore perché in corso della patogenesi tumorale (molto complessa), all'interno del tumore esistono regressioni nei processi differenziativi. Di recente, si è visto l'arricchimento a livello tumorale di cellule indifferenziate (cellule totipotenti che potrebbero poi differenziarsi nei diversi tipi cellulari a seconda degli stimoli) e questa regressione differenziativa porta le cellule a comportarsi come cellule fetali, che devono ancora maturare. Tali cellule, quindi, secernono la *feto globulina* come se fossero delle vere e proprie cellule fetali che si andranno a differenziare successivamente. Quindi, quando il tessuto si popola di cellule anaplastiche, comincia ad esprimere geni che dopo la nascita si erano arrestati e che, ora, sono stati riattivati.

- Aumenta in alcune malattie oncologiche come il carcinoma testicolare, ma anche nel liquido amniotico, quando ci sono anomalie differenziative (i nascituri presentano poi encefalia e sono destinati a morire a causa di gravi compromissioni nello sviluppo del cervello o, in alcuni casi, la spina bifida quando il tubo neurale non si chiude perfettamente).
- Diminuzioni di alpha 1-globulina, si riscontrano in corso di terapie antineoplastiche efficaci e anche nella Sindrome di Down.

ALPHA 2-MACROGLOBULINA: È una glicoproteina. Ha un PM consistente pari a 180kDa. Anche quando c'è una marcata proteinuria, questa proteina non viene filtrata. È sintetizzata dal fegato. È in grado di legare molti peptidi e ha molte funzioni. È, come l'*Alfa-1-antitripsina*, un potente inibitore delle proteasi; quindi, funziona come proteina di difesa nel caso in cui ci sia un'espressione eccessiva di proteasi, come nei processi flogistici. È un importante punto di collegamento tra svariate attività enzimatiche che interessano i sistemi della coagulazione e della fibrinolisi. Costituisce circa 1/3 delle alpha 2 globuline. Riesce a legare la *proteina mielinica basica* (rilasciata in circolo per danni a livello dei controlli nervosi) in caso di demielinizzazione o anche nella malattia di Alzheimer. Può essere considerata la proteina di difesa poiché essendo inibitore delle proteasi è in grado di inattivare le proteasi prodotte da molti batteri. Oltre alla proteina mielinica basica, l'*alpha-2-macroglobulina*, lega i prodotti che si formano per processi che riguardano il sistema nervoso centrale e questo favorisce la clearance dei *frammenti immunogeni*; quindi, è in grado di legare questi frammenti derivanti da processi di demielinizzazione e serve quindi anche a catabolizzarli e pulire l'ambiente. Lega l'interleuchina 6 senza impedirne l'attività; trasporta IL-6 nel siero per renderla disponibile ai leucociti e agli epatociti. Aumenta nella Sindrome Nefrosica, infatti a causa delle sue dimensioni molecolari non riesce a passare dai pori del vaso. Aumenta anche in gravidanza e in età senile. Tende a diminuire nelle infiammazioni acute, nelle pancreatiti e nel carcinoma della prostata. Una piccola quantità viene sintetizzata anche a livello testicolare dalle cellule del Sertoli (presenti nei tuboli seminiferi) e qua si lega all'antigene prostatico specifico e quindi ha questa capacità di legarsi al carcinoma prostatico ed in questo caso si ha una diminuzione della alpha-2-macroglobulina. Essendo un inibitore delle proteasi, quindi diminuisce la sua presenza in caso di flogosi e processo tumorale che si accompagna allo stato infiammatorio.

L'APTOGLOBINA: Ha un PM di 40kDa. È un tetramero, cioè una glicoproteina costituita da due catene alpha e due catene beta. Ha una Concentrazione di 0,4-3 gr/L. Sintetizzata dal fegato e dal tessuto adiposo, dal polmone a livello oculare dalla retina. L'aptoglobina è una proteina positiva secreta nella fase acuta dell'inflammatione e aumenta raggiungendo concentrazioni a livello sierico anche 10 volte maggiori rispetto al normale. Aumenta anche nel ridotto catabolismo della sindrome nefrosica e nelle funzioni, ad esempio, biliari. In patologie croniche si ha ridotta produzione di questa proteina insieme alle altre proteine sieriche. Lega in modo specifico l'emoglobina rilasciata nel circolo sanguigno dopo la lisi intravascolare dei globuli rossi. Il complesso aptoglobina-emoglobina viene rimosso dal circolo dal sistema reticolo-endoteliale epatico e quindi l'emoglobina viene poi divisa nella sua parte proteica, quindi la globina e nel resto. Quando viene superata la capacità dell'aptoglobina di legare l'emoglobina (lega solo l'1% dell'emoglobina prodotta dai globuli rossi), quest'ultima finisce nel filtrato glomerulare sottoforma di dimeri che vengono comunque riassorbiti a meno che non ci sia una disfunzione a livello renale che determina emoglobinuria (se c'è un eccesso di emoglobina che supera la capacità legante dell'aptoglobina). Può essere usata per monitorare gli stati di emolisi, unitamente ad altri parametri. La concentrazione diminuisce perché viene costantemente catabolizzata nel circolo. In caso di emolisi grave, l'aptoglobina è facile che raggiunga saturazione (tutti i siti di legame occupati), fino ad avere un forte filtraggio dell'emoglobina a livello renale. Se però il rene viene continuamente sottoposto a filtrare di più si va ad inficiare il normale funzionamento dell'organo.

LA CERULOPLASMINA: È una Sieroproteina. Pesa 42 kDa. Ha attività perossidasi perché è in grado di ossidare il ferro, così che venga assorbito facilmente. È il trasportatore per eccellenza del rame, il 95% è veicolato dalla ceruloplasmina ed è in grado di legare 8 atomi di rame per molecola. Ha Attività ossidasi, è in grado di ossidare le LDL, quindi, può essere considerato un fattore di rischio cardiovascolare. Le LDL-perossidasi possono indurre aterosclerosi e ictus. Le placche aterosclerotiche, a volte, possono contenere LDL-perossidasi. La ceruloplasmina andando a facilitare questa azione perossidasi non aiuta il sistema cardio-circolatorio. Abbassamento della ceruloplasmina: Mordo di Wilson, malattia autosomica recessiva, in cui si ha un difetto nel trasporto del rame. perché si ha la sintesi di una adenosintrifosfatasi che consegna il rame alla ceruloplasmina, quando questa proteina viene alterata la ceruloplasmina non lega il rame nel sito corretto, ma lo lega debolmente. Si ha quindi un'alterazione del metabolismo del rame con compromissione della sua escrezione da parte dell'epatocita tramite la bile e quindi, non circolando nei dotti biliari resterà a livello epatico.

ALPHA GLOBULINA ACIDA: Presenta residui carboidratici e proprio questi non permettono la visualizzazione del suo profilo sieroproteico. Non è possibile evidenziarne il profilo sieroproteico perché ha una bassa capacità di legare i reattivi. È sintetizzata prevalentemente dal *fegato*, dai *monociti/macrofagi*, dai *linfociti*. La sintesi è inibita dai corticosteroidi e dagli ormoni estrogeni. Esistono differenti varianti geniche. La sua variabilità dell'alpha-globulina-acida è dovuta anche al fatto che è fortemente glicosilata ed in base al tipo e alla quantità dei residui carboidratici che lega, abbiamo diverse alpha 1-glicoproteine. È stimolata dalle citochine, soprattutto IL-1 e IL-6 che sono le citochine infiammatorie più importanti e causano il processo infiammatorio e va a determinare processi di glicosilazione delle proteine.

ALFA-1-ANTICHIMOTRIPSINA (ACT): Svolge molte azioni simili all'*Alfa-1-Antitripsina*, infatti anch'essa è una proteina inibitrice delle proteasi. Le proteasi rilasciate nel corso di un'inflammatione, ad opera dei leucociti (in particolare granulociti neutrofili), vanno a danneggiare le pareti del tessuto connettivo in cui è localizzato il processo flogistico.

L'Alfa-1-Antichimotripsina è una glicoproteina di 68 kDa. è un inibitore delle serina-proteasi (serpine) ed è capace di legarsi irreversibilmente a proteasi, alla sostanza beta amiloide e al DNA. La **proteina siero amiloide** costituisce le placche neurofibrillari, tipiche della degenerazione senile. Nei pazienti affetti da Alzheimer questa proteina si accumula a livello neuronale.

L'ACT è una proteina molto eterogenea, la sua eterogeneità è dovuta alla presenza di residui glucidici (o carboidratici) di differenti glicani.

- Presenta una concentrazione plasmatica oscilla tra 0.2-0.6 g/L.
- Interviene nei meccanismi di protezione del polmone del danno da enzimi proteolitici rilasciati dai granulociti durante il processo flogistico.
- Il suo aumento in corso di inflammatione si ha già entro le 12 h dall'evento lesivo.
- È in grado di potenziare la risposta anticorpale e di inibire l'attività citotossica dei linfociti

citotossici CD8+ e dai linfociti Natural Killer e la citotossicità cellulare mediata anticorpo-dipendente. *L'ACT è stata identificata come maggiore costituente delle placche neurofibrillari associate al morbo di Alzheimer, in quanto si lega facilmente alla proteina sierica amiloide.*

BETA GLOBULINE

Valori di riferimento: 0,6-1 g/dl.

Tale frazione elettroforetica esprime principalmente il comportamento della *transferrina*, *C3*, *proteina C reattiva*, *β2-microglobulina*, *β-lipoproteine*, *Ig* (Immunoglobuline). Talvolta, in alcuni casi di elettroforesi svolte in condizioni particolari, è possibile osservare uno sdoppiamento in frazioni β1 e β2. Le due frazioni contengono:

- β1: transferrina, complemento e Ig.
- β2: microglobuline, lipoproteine e IgM.

Le Proteine della fase acuta infiammatoria positive sono: *Proteina C reattiva*. - *Transferrina*. - *Beta-lipoproteine*.

CERULOPLASMINA

Valori di riferimento: 0.2-0.4 g/L. È una glicoproteina di 132 kDa. È dotata di modesta attività ossidativa verso alcune sostanze di natura amminica e fenolica. Veicola il rame, legando fino a otto atomi di rame per molecola, controllandone l'omeostasi epatica. È in grado di ossidare le LDL, pertanto, può essere considerato un fattore di rischio di malattia cardiovascolare.

Aumento Ceruloplasmina: Gravidanza. Assunzione di anticoncezionali. Infezioni acute. Neoplasie (leucemie).

Diminuzione Ceruloplasmina: Morbo di Wilson (alterazione del metabolismo del rame con compromissione della sua escrezione da parte dell'epatocita nella bile e la conseguente sua deposizione nei tessuti).

TRANSFERRINA

Valori di riferimento: 3-3,5 g/L. È una glicoproteina monomerica di 79 kDa.

I differenti gradi di glicosilazione determinano la *microeterogeneità della proteina*.

Sono inoltre conosciute una quarantina di varianti genetiche, classificate per mobilità elettroforetica in varianti di tipo:

- *Variante C*, comunemente presenti.
- *Variante B*, più veloci.
- *Variante D*, più lente.

Quando l'elettroforesi viene realizzata in un tampone contenente Ca^{2+} , è possibile osservare uno sdoppiamento della gobba della *zona beta* in frazioni β1 e β2.

La Transferrina è deputata al trasporto del ferro nel plasma ai siti di deposito (fegato e cellule reticolo-endoteliali). In caso di sovraccarico di ferro, il sistema di trasporto può essere saturato ed il ferro in eccesso circolante viene rapidamente captato dai parenchimi. Il *complesso transferrina-ferro* viene veicolato nel plasma, si lega alle cellule che possiedono i recettori che riconoscono il legame ed infine viene internalizzato e scisso.

Aumenti della Transferrina: Stati ferro carenziali. Gravidanza. Terapia estro-progestinica **Diminuzioni**

Transferrina: Si hanno in tutte le condizioni che causano una diminuzione della *proteosintesi*. **Sindromi proteinodisperdenti.** **Anemie** (per neoplasia) (si tratta di anemie non dipendenti da ferro, perché negli stati ferro carenziali, come le *anemie sideropeniche*, si ha un aumento della transferrina dovuto a meccanismi di compensazione. Questo avviene in quanto una bassa concentrazione di ferro causa un aumento della sintesi della Transferrina, in modo tale da captare e conservare il poco ferro circolante). **Epatopatie:** per diminuzione della sintesi epatica.

FERRITINA: È una proteina deputata al deposito intracellulare di Ferro, ne può accomodare fino a 4500 atomi. Se ne conoscono differenti isoforme in base alle subunità molecolari che la compongono. La ferritina è prodotta con un meccanismo *ferro-dipendente* e un meccanismo *ferro-indipendente*.

- Meccanismo Ferro-dipendente: dipende dal livello circolante di Ferro, pertanto è proporzionale alla sua quantità. Più grande sarà la quantità di Ferro, maggiore sarà la quantità di Ferritina presente a livello cellulare (in quanto la Ferritina è una proteina che si trova a livello endocellulare).
- Meccanismo Ferro-indipendente: la sintesi ferro-indipendente è la risposta allo stimolo citochinico, perché la ferritina si comporta da proteina della fase acuta e aumenta quindi nelle condizioni infiammatorie.

La ferritina circolante nel siero contiene poco ferro; inoltre, la concentrazione plasmatica di ferritina è direttamente proporzionale al contenuto cellulare di ferritina. L'utilizzo clinico del dosaggio della ferritina è rivolto alla misura del compartimento di deposito di ferro.

- L'intervallo di normalità della ferritina sierica è di 15-300 µg/L.
- Valori inferiori a 12-15 µg/L indicano l'esaurimento delle scorte tissutali di ferro, mentre un sovraccarico di ferro determina incrementi di *ferritinemia* di 5-10 volte rispetto alla concentrazione normale.

Una volta si aveva sovraccarico di ferro nei casi di trasfusioni sanguigne frequenti, su soggetti che soffrivano ad esempio di Talassemia. Questo avveniva poiché il sangue trasfuso era intero, di conseguenza si osservava un sovraccarico marziale di ferro, poiché col sangue si fornivano non solo gli eritrociti, ma anche tutti gli altri elementi associati. Ormai le sacche ematiche si possono trovare in diverse forme, per esempio le "pappe eritrocitarie" forniscono esclusivamente eritrociti. Infine, l'ipertiroidismo funge da potente stimolo per la protidosintesi di ferritina circolante.

BETA-2-MICROGLOBULINA: La β -2-microglobulina è una proteina plasmatica, ma costituisce anche la catena leggera dell'antigene di classe I del *sistema maggiore di istocompatibilità* (che ricordiamo essere importante per la sollecitazione dei linfociti citotossici).

Appartiene alle microglobuline, ossia le globuline a basso PM (<40 kDa).

L' MHC di classe I è presente sulla superficie di tutte le cellule nucleate.

Il complesso "MHC I-peptide non self" viene riconosciuto dai linfociti T_C (citotossici) e CD8⁺. -

L'intervallo di riferimento nel plasma è di: 0.7 - 2.5 mg/L.

Dato il basso peso molecolare è facilmente filtrabile nelle urine a livello del glomerulo renale, dove viene poi riassorbita dal lume del tubulo prossimale; essa è utilizzata come indice di funzione renale poiché aumenta nel plasma in caso di insufficienza renale e aumenta nelle urine in presenza di *tubulopatia*.

L'aumentata sintesi in corso di malattie autoimmuni e immunoproliferative rende questa proteina utilizzabile in queste patologie.

Le microglobuline comprendono anche:

- **Alfa-1-microglobulina:** è una glicoproteina secreta dal fegato e pancreas che filtra facilmente nell'urina e nel liquido interstiziale. interagisce con molecole proteiche, come ad esempio l'albumina.

Sempre a causa del peso molecolare molto basso, la sua concentrazione urinaria, insieme a quella di altre proteine, è utilizzata nella classificazione delle proteinurie.

- **Proteina Siero Amiloide (SAA):** il termine siero amiloide indica due isotipi di apolipoproteine (siero amiloide A1 e siero amiloide A2) di PM 11.6 kDa, la cui sintesi aumenta grandemente nelle fasi iniziali dell'infiammazione acuta.

Le concentrazioni plasmatiche sono comprese tra 0.8-9 mg/L. è una apolipoproteina multifunzionale appartenente ai meccanismi di difesa antinfettivi dell'immunità naturale. Ha funzioni immunoregolatrici, chemiotattiche e opsonizzanti nei confronti di linfociti, anticorpi, macrofagi e fagociti. Nello specifico è in grado di attirare i macrofagi tramite le opsonine. Lega le HDL e provvede alla clearance del colesterolo di origine cellulare nella sede di infiammazione. È sintetizzata prevalentemente dal fegato ed in misura minore da macrofagi, cellule endoteliali e dal muscolo liscio. Molto importante ricordare che è indotta dallo stimolo flogistico, poiché nel momento in cui c'è lo stimolo flogistico e la SAA viene attivata, vengono attivate anche le azioni immunoregolatrici e l'attività dei macrofagi e dei monociti nel processo di fagocitosi; quindi, è una proteina difensiva estremamente importante. La sintesi di SAA è fortemente indotta da IL-1, IL-6 e glucocorticoidi, raggiungendo valori in seconda giornata, in seguito a stimolo flogistico, molto variabili (da 50-1500 mg/L).

o Elevati livelli, cronicamente persistenti, possono avere effetti dannosi consistenti nella precipitazione fibrillare di frammenti di clivaggio proteolitico di SAA sotto forma di sostanza amiloide (amiloidosi AA).

o Le applicazioni diagnostiche di SAA sono le stesse della PCR, con alcune differenze: nel paziente trapiantato, sottoposto a trattamento antirigetto con ciclosporina (è un immunosoppressore e antinfiammatorio), la PCR aumenta se c'è infezione, ma è assente in una situazione di rigetto.

La SAA, invece, non è soppressa dalla ciclosporina e aumenta nella crisi di rigetto.

Dunque, l'associazione di PCR e SAA nel monitoraggio del paziente trapiantato è in grado di discriminare tra crisi di rigetto e infezione.

Quindi: *PCR* → *Marker d'infezione SAA* → *Marker di rigetto*

Le proteine sieriche sono molto importanti per il monitoraggio del processo flogistico. Quest'ultimo non può essere monitorato tramite il dosaggio di un singolo parametro, ma tramite il dosaggio di più parametri flogistici e soprattutto del follow-up, per capire il decorso della flogosi.

Spesso si parla di "Batteria di proteine sieriche" proprio perché vengono dosate insieme.

PCR (Proteina C Reattiva): La proteina C reattiva è considerata come la proteina di riferimento per individuare l'infezione in fase acuta. È priva di componente glucidica e ha un PM di 105 kDa. Viene prodotta dal fegato e la concentrazione plasmatica ha una soglia: 5mg/L. È stata identificata nel 1930 come proteina reagente con il polisaccaride capsulare C dello pneumococco e successivamente è stata considerata una proteina della fase acuta. Si lega ai polisaccaridi batterici e alle molecole esposte sulla superficie delle cellule danneggiate, attivando la via classica del complemento. In presenza di stimolo infiammatorio intenso raggiunge il picco di risposta entro 20-40 ore e diminuisce con un tempo di dimezzamento di 12-18 ore. La PCR, tuttavia, non è utilizzabile per le infezioni del tratto urinario o nella diagnosi di appendicite. La PCR, quando utilizzata come singolo dosaggio, ha dimostrato potenzialità diagnostica insufficiente in alcune categorie di pazienti. Questo avviene perché a volte, nonostante sia presente un processo flogistico, i valori non subiscono variazioni significative. È importante la sua misurazione temporale, con prelievi distanziati, in particolar modo dopo un intervento chirurgico.

Il dosaggio di PCR è di grande utilità: Per conoscere precocemente le complicanze postoperatorie (soprattutto in prima e seconda giornata, poiché se la PCR rimane elevata significa che il decorso post-operatorio non sta andando bene); Per misurare lo stato di attività e la risposta terapeutica nel caso dell'artrite reumatoide; Per riconoscere la comparsa di infezioni nel corso di malattie infiammatorie o autoimmuni (per esempio LES o colite ulcerosa, che comportano un aumento della PCR); Per segnalare precocemente la possibile infezione intrauterina nella rottura prematura di membrane in ostetricia; Per distinguere tra infezione e malattia da trapianto allogenico nei pazienti con trapianto di midollo osseo.

La concentrazione di PCR è il punto finale di una cascata infiammatoria che stimola i monociti e macrofagi a liberare *IL-1* e *IL-6* (che sono le due citochine di eccellenza liberate nel corso di un'infiammazione), giungendo poi alla sintesi epatica di proteine della fase acuta. La PCR aumenta in corso di incidenti cardiovascolari, di diabete, di obesità (con rilascio da parte del tessuto adiposo di IL-6). Quando c'è incremento di PCR in soggetti con infarto miocardico, l'evoluzione della patologia è più frequentemente associata ad esito sfavorevole. La PCR si associa al profilo delle gammaglobuline, quindi se il processo flogistico si trova in una fase avanzata o in regressione, in base all'altezza della banda.

PROTEINE DEL COMPLEMENTO: Il termine complemento si riferisce alla funzione delle proteine che lo compongono: esse *complementano la funzione degli anticorpi nell'eliminazione dei microbi*. La dimostrazione della presenza delle proteine del complemento nel siero venne ottenuta da Bordet in seguito all'osservazione che, aggiungendo alla coltura batterica e al siero immune preriscaldato a 56° C, un siero fresco non immune e quindi non contenente gli anticorpi verso i batteri, i batteri venivano nuovamente lisati. Nel siero sono contenute dunque delle proteine termolabili che aiutano gli anticorpi nella lisi dei batteri. Queste proteine vennero così chiamate da Bordet proteine del complemento o sistema del complemento. **Il sistema del complemento** è costituito da una ventina di proteine plasmatiche sintetizzate dal fegato. È componente termolabile del plasma (resistono per 30' a 56°C), dopodiché vengono inattivate.

Funzioni:

1. Reclutamento cellule infiammatorie: azione complementare a quella degli anticorpi.
2. Aumento opsonizzazione batteri.
3. Induzione lisi dei batteri.
4. Azione antivirale.

Il sistema del complemento prevede un'**attivazione proteolitica a cascata** con tre vie di attivazione. Il fine ultimo dell'attivazione del complemento è l'**uccisione dei batteri**, che avviene tramite la formazione del complesso del **MAC** (Complesso di attacco alla membrana) con creazione di pori nella parete dei microrganismi. L'attività del complemento è localizzata nella zona di innesco ed è di breve durata. Le molecole del complemento sono indicate come C1, C2, C3, ecc. oppure con lettere. Durante l'attivazione, quindi con la presenza di un patogeno, ogni componente viene scisso in due frammenti di diversa dimensione, ad esempio C1 viene scisso in C1-A e C1-B. Di questi due frammenti, uno prende parte alla reazione, mentre l'altro viene catabolizzato.

VIE DI ATTIVAZIONE DEL COMPLEMENTO:

1. **Via classica:** viene attivata dagli immunocomplessi (Ag+, IgG ed IgM), quando dunque ci sono già anticorpi, e dal C1.
2. **Via alternativa o properdinica:** viene attivata dai prodotti batterici o virali e dal C3. La componente C3 è una proteasi poco stabile che, quando incontra un batterio, espone un sito attivo e fa partire l'attivazione del componente C3.
3. **Via lectinica:** viene attivata dall'interazione tra la lectina legante il mannosio (MBL) ed i residui di mannosio presenti sulla superficie dei microrganismi (molto simile alla via classica).

SCHEMA RIASSUNTIVO DELLE FUNZIONI BIOLOGICHE DEL COMPLEMENTO

1. **Lisi cellulare (MAC)**
2. **Opsonizzazione (C3b, iC3b e C4b)**
3. **Attivazione del processo infiammatorio** attraverso il rilascio dei frammenti:
 - a) **chemiotattici (C3a, C5a)** che inducono la **diapedesi** e la **chemiotassi** dei neutrofili e monociti;
 - b) **anafilattici (C3a, C4a, C5a)** che inducono la **degranulazione** dei mastociti e dei basofili con conseguente liberazione di istamina e altre sostanze farmacologicamente attive che provocano la **contrazione della muscolatura liscia** e un **aumento della permeabilità vascolare**.
4. **Sensibilizzazione ed eliminazione dei complessi immuni (C3b).**

La componente C3 può essere dosata e occupa un ruolo fondamentale in quanto viene allertato anche in assenza di anticorpi.

L'esplorazione del sistema del complemento ha lo scopo di individuare deficit genetici o acquisiti o di dimostrare l'attivazione della via classica o della via alternativa.

L'unica proteina visibile all'elettroforesi delle sieroproteine è il C3, che ricade nella zona beta.

FRAZIONE C3 DEL COMPLEMENTO: Valori di riferimento: 3-3.5 g/L. Quando l'elettroforesi viene realizzata in un tampone contenente ioni Ca^{2+} , è possibile osservare uno sdoppiamento in frazioni β_1 e β_2 . Con il termine di Complemento si comprendono un insieme di proteine, alcune delle quali con attività enzimatica, che insieme agli anticorpi svolgono un ruolo di primaria importanza nei **meccanismi di difesa dell'immunità umorale**.

Aumento Frazione C3: Anemia emolitica, perché si determina consumo del complemento. Epatiti.

Diminuzione Frazione C3: Blocco del suo catabolismo in cirrosi biliare primitiva. Fase acuta (dopo 5-6 giorni), perché dopo una prima fase di incremento viene consumato e si riduce.

GAMMAGLOBULINE ANTICORPO: IMMUNITÀ SPECIFICA UMORALE: Gli anticorpi sono glicoproteine che hanno la capacità di legarsi in maniera specifica agli antigeni (microorganismi infettivi come batteri, tossine), o qualunque macromolecola estranea.

Kabat e Tiselius nel 1939 dimostrarono per primi un aumento della frazione delle gammaglobuline nel siero di conigli immunizzati con ovalbumina. Nei conigli immunizzati si aveva un profilo sieroproteico totalmente diverso, in quanto la terza banda (gamma) aveva una banda molto più ampia rispetto a prima dell'immunizzazione. Questo fece comprendere che l'immunizzazione faceva aumentare l'attività degli anticorpi.

Gli anticorpi hanno una forma simile ad una Y e sono costituiti da due parti differenti:

1. **La regione costante (C)**, che è comune a tutte le immunoglobuline appartenenti allo stesso isotipo.
2. **La parte variabile (V)**, che contiene il sito di combinazione con l'antigene e che è quindi variabile a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene.

Tutti gli anticorpi hanno uno scheletro comune, formato da 2 catene leggere (L) e 2 catene pesanti (H), caratterizzate da un dominio immunoglobulinico. Alcuni sono in forma monomerica, altri in forma dimerica o pentamerica. Le catene leggere hanno un PM ognuna di 23 kDa; le pesanti un PM di 51-70 kDa. Gli anticorpi sono caratterizzati da domini chiamati *domini immunoglobulinici*, formati da cisteine che formano dei ponti tra gli amminoacidi. Sono stati condotti molti studi sugli anticorpi, in cui è stato osservato che dopo digestione enzimatica (*papaina*) le Ig si suddividono nel **frammento Fab** o frammento legante l'antigene (rappresenta la regione variabile), e nel **frammento Fc**, detto frammento cristallizzabile (così chiamato poiché precipitava in soluzione).

CLASSI DI IMMUNOGLOBULINE: Le immunoglobuline umane sono suddivise in 5 classi principali, elencate in ordine decrescente di concentrazione sierica: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Le catene leggere sono comuni alle cinque classi di immunoglobuline, che invece differiscono per le catene pesanti: γ per le IgG - α per le IgA - μ per le IgM - δ per le IgD - ϵ per le IgE.

IgG: maggior classe presente nel siero (80%) - sono le uniche Ig che passano dalla madre al feto attraverso la placenta, conferendo al nascituro una protezione per i primi 5-6 mesi subito dopo la nascita. Entrano in gioco nella seconda risposta anticorpale, sono le Ig più persistenti, durano per anni e danno la memoria.
Valori: 600-1800 mg/dl PM: 146-170 kDa Emivita di 20 gg

IgA: concentrazione bassa nel siero, alte nelle secrezioni (saliva, latte, secrezioni intestinali). Sono molto importanti per la protezione degli organi interni, soprattutto per il sistema gastroenterico e le mucose. Si possono trovare sia in forma monomerica che dimerica.
Valori: 90-400 mg/dl PM: 160 kDa, dimeriche 380-400 kDa Emivita di 6 gg

IgM: molecole complesse - risposta immunitaria primaria - sono presenti oltre che nel siero anche sulla membrana dei linfociti V (Ig di membrana). Presentano una struttura pentamerica.
Valori: 80-190 mg/dl PM: 970 kDa Emivita di 5 gg

IgD: Rappresentano lo 0,2% delle immunoglobuline circolanti. Sono presenti sulla membrana cellulare dei linfociti B, dove legano l'antigene per cui sono specifiche; inducono l'attivazione della cellula a proliferare, maturare a plasmacellula e a produrre in forma solubile anticorpi.
PM: 184 kDa Emivita di 3 gg

IgE: Sono presenti nel siero in concentrazione bassissima in forma monomerica. Sono responsabili della risposta ai parassiti. Il frammento Fc delle IgE si lega ai recettori di membrana dei mastociti e dei granulociti basofili; qui le IgE, dopo combinazione con gli antigeni corrispondenti, inducono la liberazione da parte delle stesse cellule dei mediatori responsabili delle reazioni allergiche di I tipo, come l'istamina.
PM: 190 kDa Emivita di 3 gg

Con l'arrivo dell'allergene, come ad esempio un polline generico, si ha una prima sollecitazione per la produzione di anticorpi specifici contro l'allergene (chiamata **reazione di sensibilizzazione**). Nel momento in cui si è sottoposti ad una seconda esposizione all'allergene (chiamata **reazione scatenante**), gli anticorpi formati nella reazione di sensibilizzazione, in particolare il frammento C degli anticorpi, vengono riconosciuti dai recettori posti sui mastociti. Il legame tra allergene e anticorpo crea una torsione che fa partire un segnale che va dalla membrana del mastocita fino ai granuli di istamina, determinandone il rilascio. Quest'ultima provocherà vasodilatazione, aumento permeabilità e richiamo altri mediatori secondari.

VARIAZIONI DEL PROFILO DELLE IMMUNOGLOBULINE NEL QUADRO SIEROPROTEICO

- **Ipgammaglobulinemie:** Essa è una condizione fisiologica nell'infanzia dopo la riduzione e scomparsa entro il 6° mese delle IgG materne, presenti per passaggio transplacentare. Dal 3° anno di età in poi gli anticorpi raggiungono man mano i livelli dell'adulto. Riduzioni di Ig possono essere dovute a immunodeficienza umorale:

1. **Primitiva:** in cui si hanno deficit genetici o di maturazione dei linfociti B. Alcune riduzioni di immunoglobuline possono essere dovute alla maturazione particolare di un clone linfocitario, o alla mancanza di sviluppo. Un esempio di deficit genetico è la *malattia di Bruton*, una malattia autosomica recessiva caratterizzata da mancanza di linfociti B e riduzione o assenza di immunoglobuline (*alfagammaglobulinemia*); le persone affette da questa malattia vanno spesso incontro a malattie infettive.

2. **Secondaria:** a malattie linfoproliferative, malnutrizione, sindrome nefrosica e altre, come ad esempio la differenziazione dei linfociti in plasmacellule.

● **Ipergammaglobulinemie:** Esse possono essere di tipo *policlonale* o *monoclonale*. Nel primo caso stimoli immunogeni portano all'attivazione di differenti cloni B linfocitari, con numerose immunoglobuline diverse. Nel secondo caso stimoli mutageni portano alla trasformazione neoplastica di un linfocita B in plasmacellula, provocando una proliferazione clonale limitata o incontrollata, con aumento di un'unica immunoglobulina. L'immunoglobulina prodotta non è sempre completa, a volte infatti presenta anomalie, con la sola produzione di catene leggere o pesanti.

1. Le **ipergammaglobulinemie policlonali** sono dovute a:

- o Epatopatie croniche (cirrosi, epatiti croniche).
- o Malattie autoimmuni.
- o Infezioni protratte e croniche

Solitamente l'ipergammaglobulinemia policlonale consiste in un incremento contemporaneo delle tre classi immunoglobuliniche (IgG, IgA, IgM):

- Le IgA aumentano in corso di infezioni cutanee, intestinali, respiratorie e renali;
- Le IgM nelle infezioni virali primarie o da parassiti;
- Le IgE nelle malattie allergiche;
- Le IgG nelle malattie autoimmuni e nelle croniche; in quest'ultimo caso, dopo un primo stimolo antigenico che da origine alle IgG, si ha una iperproduzione, in primo luogo, di IgM e poi di IgG.

2. **Componenti monoclonali:** gli stimoli mutageni che danneggiano i meccanismi di controllo della proliferazione di un clone immunocitario comportano la sua proliferazione, e dunque l'aumento di quel clone mutato. Il clone viene dunque programmato a produrre un'unica classe di Immunoglobuline. Delle volte si ha secrezione, ossia produzione, di **catene immunoglobuliniche monoclonali (CM)** non sempre sotto forma di Ig completa. La misurazione e la quantizzazione del clone monoclonale è indicativo della malattia, per comprendere il tipo di esordio della malattia, se sta progredendo, se risponde bene alla terapia o meno. Di conseguenza, la grandezza della curva gaussiana (quindi il suo livello plasmatico) a livello delle immunoglobuline nella monoclonalità è una misura indiretta della massa cellulare del clone neoplastico. La presenza di CM è individuabile con una sensibilità del 92% all'osservazione dell'elettroforesi delle sieroproteine se praticata con un metodo ad alta risoluzione in agarosio o con elettroforesi capillare.

DOSAGGIO DELLE PROTEINE DEL PLASMA: In biochimica clinica si misura normalmente il rapporto tra l'albumina e le globuline in un campione di siero (tale rapporto varia da 1:1 a 2:4, e solitamente compare al di sotto del profilo sieroproteico), riportando la **frazione globulinica**, come *differenza tra le proteine totali e l'albumina*.

Le immunoglobuline vengono misurate come classi, per le proteine specifiche ed ormoni vengono adoperati metodi immunochimici. Gli enzimi vengono misurati sia mediante la determinazione della loro attività, sia con metodi immunochimici per determinare la loro massa.

- Il **plasma** è composto per il 90% da acqua, in cui sono disciolti sali e proteine plasmatiche: albumina, fibrinogeno e fattori della coagulazione e le immunoglobuline.
- Il **siero** è semplicemente plasma privo di *fibrinogeno, fattore VIII, fattore V e protrombina*. Si ottiene lasciando coagulare il sangue e successivamente centrifugando (o semplicemente lasciando depositare sul fondo del recipiente la parte coagulata, più pesante.).

L'**elettroforesi delle proteine sieriche** rappresenta l'esame d'elezione per il riconoscimento (omogeneità molecolare) e la quantificazione (tramite densitometria) di tutte le componenti proteiche normali, patologiche e monoclonali. (elettroforesi = nei riassunti di STL)

ELETTROLITI ED EQUILIBRIO ACIDO BASE: Facendo riferimento agli elettroliti essi svolgono un ruolo fondamentale, nel mantenimento della pressione idrostatica, nella volemia plasmatica, altri sono da supporto, ad esempio, alcuni si localizzano nello scheletro. Il mantenimento idrico nel nostro organismo è fondamentale per la sopravvivenza dell'uomo ed è dovuto da diversi ioni, come:

- Il **sodio**, che quando si muove porta con sé una quantità rilevante di acqua (il potassio è uno ione altamente idratato).
- Il **potassio**, il **cloruro** e i **bicarbonati**, i quali sono regolatori del pH (in particolar modo i *bicarbonati*). Sono coinvolti nel mantenimento della contrattilità muscolare (in particolare il *potassio*), nelle reazioni di ossido riduzione e nella regolazione di funzioni enzimatiche (come il *calcio*, messaggero a livello cellulare).

Calcio e magnesio rientrano di meno nell'omeostasi idrica perché sono ioni meno idratati, in quanto formano legami con l'albumina; sono presenti soprattutto a livello scheletrico.

Quando si parla di elettroliti si fa riferimento a *sodio*, *potassio*, *cloro* e allo *ione bicarbonato*; la loro concentrazione definisce il **profilo elettrolitico** importante per conoscere lo stato di idratazione del corpo.

Da cosa siamo principalmente costituiti? Principalmente da **acqua** (un adulto medio di 70 kg si costituisce di 40/42 kg di acqua), distribuita nei compartimenti intra ed extra cellulare. L'acqua viene richiesta dal nostro organismo sia a livello intracellulare (ICF) che extracellulare (ECF). Il contenuto di acqua intracellulare è circa il doppio di quello extracellulare. Quando si parla di **ritenzione idrica** si ha aumento sia di ICF che ECF mentre, quando si parla di **disidratazione** si ha una diminuzione sia di ICF che di ECF. In condizioni fisiologiche i movimenti degli ioni sono regolati da gradienti elettrochimici; infatti, uno ione si muove seguendo sia il proprio gradiente elettrico che quello di concentrazione, muovendosi quindi per *diffusione passiva*, ma che non può essere unica in quanto avremmo una disuguaglianza di movimento di ioni, soprattutto del sodio e del potassio. In effetti, queste diverse concentrazioni ioniche all'interno e all'esterno delle cellule sono mantenute grazie alle **pompe** come quella **sodio-potassio** (pompa maggiormente rappresentata nelle cellule, importante nella regolazione della *pressione osmotica*).

Nell'organismo è quindi presente acqua unita a soluti (e non acqua in forma pura); i fattori che regolano lo spostamento dei fluidi attraverso le membrane cellulari sono l'**osmolalità** e la **pressione osmotica**.

- Per osmolalità si intende lo spostamento della componente acquosa da un compartimento all'altro.
- Per pressione osmotica si intende lo spostamento di acqua e soluti, in particolare *cloruro di sodio*, attraverso parete dei capillari e delle membrane plasmatiche.

Gli elettroliti, sostanze in grado di portarsi dietro cariche sono distribuiti, per quanto riguarda i cationi:

- Il **sodio** è concentrato prevalentemente nel compartimento extracellulare.
- Il **potassio** è prevalentemente distribuito nel compartimento intracellulare.

Per quanto riguarda gli anioni:

- Il **cloruro** e il **bicarbonato** sono maggiormente rappresentati nel compartimento extracellulare.
- Le **proteine** e il **fosfato** sono prevalentemente presenti nell'ambiente intracellulare.

Sono comunque presenti altre sostanze prive di cariche elettriche nell'organismo ma, che esercitano una scarsa influenza sull'osmolarità.

DISTRIBUZIONE DEGLI IONI NEL PLASMA

Il **sodio** è l'elemento più rappresentato nel *plasma* seguito da *cloro*, *bicarbonato*, *proteine* ed altri *ioni* presenti in minima quantità.

- La distribuzione nel **liquido interstiziale** e **intracellulare** vede alcune differenze quantitative soprattutto tra il *sodio* ed il *potassio*; infatti:
- Il sodio è molto presente nel liquido interstiziale e diminuisce notevolmente all'interno della cellula;
- Viceversa, accade per il potassio.
- All'interno della cellula troviamo in quantità medio-alta i *fosfati*, *solfati*, *magnesio* e *proteine*.
- All'esterno è presente il *cloro* ed una buona distribuzione di *ioni bicarbonato*, responsabili del mantenimento del pH.

Tutti gli ioni hanno effetto sul movimento dell'acqua; l'acqua si sposta solitamente seguendo il proprio gradiente di concentrazione (da zone dove è più diluita verso zone in cui c'è una maggiore concentrazione di soluto) per mantenere un certo *equilibrio*. Questo accade in tutte le soluzioni fisiologiche, dove viene

mantenuto un equilibrio ionico tra l'interno e l'esterno della cellula e così, dunque, anche l'acqua si mantiene in equilibrio.

Le sostanze in soluzione hanno una loro influenza; ioni e soluti determinano la loro concentrazione nella soluzione delineando una certa pressione, esercitando inoltre un *effetto osmotico* dovuto dal numero di molecole non ionizzate e di ioni in una determinata unità di volume. Per cui, le concentrazioni si possono esprimere in **osmolalità** (mmol/kg) e in **osmolarità** (mmol/L). è espressa per litro di acqua.

L'osmolalità dà origine alla tonicità plasmatica e cellulare, ossia il numero complessivo di soluti disciolti in una determinata quantità di solvente.

Per quanto riguarda l'**osmolalità del siero**, si prendono in riferimento le concentrazioni raddoppiate del *sodio* e *potassio* sommate alla concentrazione dell'*urea* e del *glucosio*. Generalmente urea e glucosio hanno valori molto bassi e perciò non influenzano l'osmolalità del siero; diversamente vengono valutati quando i valori sono fuori dal range di riferimento e quindi, in caso di diabete o quando c'è un eccesso di urea nel sangue (osservabile in caso di insufficienza renale).

L'osmolalità del siero e ECF è pari a 285 mmol/kg in condizioni fisiologiche.

Considerando che siamo costituiti prevalentemente da acqua, c'è un equilibrio di distribuzione di acqua e soluti tra i due compartimenti, a cui viene aggiunta la quantità di acqua ingerita ed eliminata quotidianamente. In effetti, quando parliamo di acqua, dobbiamo considerare tutta la componente idrica assunta (cibo, bevande) per cui possiamo dire che il bilancio idrico giornaliero è intorno ai 2,5 litri, normalmente in pareggio con quella che perdiamo.

ACQUA INTRODOTTa		ACQUA ELIMINATA	
Bevuta	1500 ml	Con urina	1500 ml
Nei cibi	700 ml	Attraverso respiratio insensibilis	500 ml
Metabolica	300 ml	Attraverso polmoni	300 ml
	2500 ml	Attraverso feci	200 ml
			2500 ml

Così la quantità di liquidi presente nel compartimento intracellulare ed extracellulare è in equilibrio. La pressione osmotica che gli ioni esercitano sul volume di acqua, espressi in termini di *mEq*, non esibisce sostanziali differenze in condizioni di equilibrio. Invece, se ci sono condizioni di disidratazioni, quindi disequilibrio, l'acqua si sposta verso zone con maggiore concentrazione di soluto, dove è necessario diluire i soluti in eccesso. Il volume di fluido del compartimento extracellulare è essenzialmente mantenuto costante dalla concentrazione di *sodio*, quello del compartimento intracellulare è invece mantenuto dalla concentrazione del *potassio*.

L'acqua, diffondendosi per osmosi dall'uno all'altro compartimento, fa sì che la pressione osmotica sia uguale; questo accade in quanto *sodio* e *potassio* si muovono all'interno e all'esterno delle cellule seguendo il proprio gradiente di concentrazione ma, viene sempre ribaltato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi. Altrimenti nessuno ione si sposterebbe in quanto, il potassio essendo concentrato all'interno, per gradiente di concentrazione dovrebbe muoversi dall'interno verso l'esterno raggiungendo il 50%; allo stesso modo il sodio con movimento contrario, ossia dall'esterno all'interno, raggiungendo il 50% ma a questo punto si avrebbe una *staticità* che non permetterebbe i messaggeri, la contrattilità, il potenziale d'azione e contrazione muscolare. Dunque, tutto questo viene messo in discussione dalle pompe Na^+/K^+ ATPasi, facendo sì che il *sodio* venga espulso dalla cellula ed il *potassio* venga inviato all'interno della cellula così da ristabilire il disequilibrio. Anche l'acqua segue le concentrazioni dei soluti.

CLORO: È il principale anione extracellulare. È filtrato dal glomerulo e riassorbito insieme al sodio, a livello del tubulo contorto prossimale e dotto ascendente dove interviene la pompa dei cloruri. Il cloro contenuto nelle urine nelle 24 ore è tra le 88-245 mEq, ma anche perso attraverso il sudore, in base alla quantità è possibile diagnosticare la fibrosi cistica.

Aldosterone: L'aldosterone è un mineralcorticoide che viene sintetizzato dalla porzione glomerulare delle ghiandole surrenali che influenza la ritenzione sodica e quindi anche quella acquosa.

L'**apparato iuxtaglomerulare** influenza profondamente il riassorbimento del sodio; osservandolo da un punto di vista anatomico si potrà individuare la Capsula di Bowman.

L'apparato iuxtaglomerulare è posto in corrispondenza del polo vascolare ed è costituito:

- Dalla **Macula Densa**, un tessuto extratubulare appartenente al tubulo distale e posto vicino al glomerulo.
- Da *cellule specializzate* ossia **cellule iuxtaglomerulari**, recettrici e secreteurici, che circondano un tratto dell'arteriola afferente, che afferisce nel glomerulo.

L'arteriola afferente, infatti, prima di entrare nella Capsula di Bowman, presenta delle cellule (in rosa nella figura) secreteurici di **renina**, un enzima proteolitico.

Queste cellule rilasciano renina in seguito a:

- Stimolazione del sistema simpatico.
- Caduta della concentrazione plasmatica di sodio.
- Ridotta distensione delle pareti arteriolari, dovuta a diminuzione della pressione arteriosa o delle catecolamine.

Stimolazione del sistema simpatico

Queste cellule specializzate, chiamate cellule iuxtaglomerulari, sono dei veri e propri sensori del volume ematico:

- Se il volume ematico diminuisce le cellule perdono turgore e tonicità, risultando così flaccide e appiattite e venendo di conseguenza stimulate a produrre renina.
- Se il volume ematico aumenta, queste cellule sono invece soggette ad una maggiore distensione e di conseguenza viene indotto uno stimolo inibitorio da parte del sistema simpatico che causa minore produzione di renina.

Caduta della concentrazione plasmatica di Sodio: Queste cellule specializzate sono in contatto con le cellule della macula densa. Osservando il nefrone si riconoscono diverse strutture in successione: tubulo contorto prossimale, ansa di Henle, tubulo contorto distale e dotto collettore. I due tubuli (prossimale e distale) sono molto convoluti e formano una serie di anse, in particolare una parte del tubulo distale si posiziona anatomicamente tra l'arteriola afferente e l'arteriola efferente. La macula densa è una struttura microscopica localizzata nel tubulo renale distale, nel punto in cui quest'ultimo attraversa il polo vascolare del glomerulo da cui è originato. Quindi, la macula densa è composta da cellule recettrici della concentrazione del sodio che mandano segnali tramite contatto diretto alle cellule iuxtaglomerulari.

Da questi segnali parte uno stimolo per la sintesi della renina:

- Se la concentrazione plasmatica di sodio diminuisce, viene stimolata la produzione di renina.
- Al contrario, se la concentrazione plasmatica di sodio aumenta, viene inibito il rilascio di renina.

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE (RAAS)

1. La renina rilasciata agisce su una proteina di origine epatica, una α -2-globulina, l'**angiotensinogeno**.
2. L'angiotensinogeno, tramite il distacco di amminoacidi causato dalla renina (essendo quest'ultima un enzima proteolitico), viene convertito in **angiotensina I**.
3. L'angiotensina I non è il prodotto terminale, ma viene convertito in **angiotensina II** dall'enzima **ACE** (enzima di conversione dell'angiotensina iperespresso a livello polmonare, renale e cerebrale). (*rispetto alla forma precedente l'angiotensina II ha perso due amminoacidi*)
4. L'angiotensina II agisce infine a livello della corteccia renale, stimolando la produzione di **aldosterone**.

L'obiettivo di questo sistema è quello di correggere i parametri che hanno fatto partire l'impulso, come ad esempio l'*ipotensione*, l'*ipovolemia* e l'*iponatriemia*. La prima correzione attuata dall'angiotensina II è il recupero della pressione ematica, che avviene tramite vasocostrizione a livello periferico e a livello renale (quest'ultima avviene tramite vasocostrizione a livello della Capsula di Bowman). L'angiotensina II, stimolando il rilascio dell'aldosterone da parte della corteccia surrenale, aumentando il riassorbimento del sodio a livello del tubulo distale. In questo modo si avrà un riassorbimento di sodio che correggerà l'iponatriemia, ma insieme al sodio verrà riassorbita anche acqua, correggendo così anche l'ipovolemia e l'ipotensione. Le cellule della Macula Densa sono le prime a percepire una riduzione del sodio, successivamente mandano segnali alle cellule iuxtaglomerulari. Queste ultime, invece, sono più sensibili alla riduzione della volemia.

MECCANISMO DELL'ORMONE ANTIDIURETICO (ADH): Si affianca al RAAS il meccanismo dell'ormone ADH. Il tasso con cui l'acqua viene drenata nel liquido interstiziale attraverso le pareti dei dotti collettori dipende dalla permeabilità all'acqua dell'epitelio della parete del dotto. La presenza di un'urina più

o meno concentrata dipende dalla presenza di ADH (chiamato anche **vasopressina**). L'ormone antidiuretico (ADH), liberato dalla *neuroipofisi*, regola la permeabilità all'acqua del dotto collettore e di conseguenza la quantità di acqua persa con l'urina. Maggiore è il livello di ADH, più permeabile è il dotto collettore! La neuroipofisi è strettamente connessa all'ipotalamo poiché raccoglie le lunghe terminazioni nervose provenienti dall'ipotalamo stesso, nel quale si trovano i corpi cellulari di questi neuroni. L'ADH è un neuropeptide, poiché viene prodotto da cellule nervose, infatti si parla di *neurosecrezione*.

- **Ipotalamo:** I neuroni sensibili alla pressione oncotica rispondono ad un aumento dell'osmolarità del plasma in caso di disidratazione, o quando c'è una caduta pressoria, con un aumento della loro presenza di scarica. La parte terminale dei neuroni ipotalamici termina a livello neuroipofisario. L'ADH viene sintetizzato come proteina nei corpi cellulari ipotalamici, dopodiché viaggia lungo gli assoni e giunge alla neuroipofisi.
- **Neuroipofisi:** Dalla neuroipofisi l'ADH viene rilasciato, causando un maggiore permeabilità dei dotti e dunque maggiore ritenzione idrica.

Tuttavia, ogni fattore che determina un aumento della pressione arteriosa (per aumento del volume ematico) inibirà i *neuroni ipotalamici* e di conseguenza il rilascio di ADH. In tal caso verrà persa un'urina a più elevato contenuto di acqua. Una volta che il volume ematico viene ristabilito, si avrà una riduzione della frequenza di scarica dei neuroni.

In assenza di ADH, il rene umano non sarebbe in grado di riassorbire gran parte dell'acqua, di conseguenza l'urina sarebbe diluitissima.

L'EQUILIBRIO ACIDO-BASE: In condizioni fisiologiche il pH ematico è circa 7,4 (precisamente 7.35 e 7.45). Il pH dei liquidi dell'organismo (come il sangue, il liquido interstiziale, il liquido intracellulare, il liquor) si mantiene costante anche se è sottoposto a continui spostamenti per azione dei prodotti dell'attività metabolica cellulare. Nell'uomo la maggior parte dei prodotti metabolici derivati dagli alimenti è costituita da:

1. **Acidi forti**, come l'*acido cloridrico* (HCl) e l'*acido fosforico* (H₃PO₄), che si formano dall'ossidazione di alcuni amminoacidi presenti nelle proteine e viaggiano nella loro forma dissociata;
2. E soprattutto da un **acido debole**, l'*acido carbonico* (H₂CO₃), che si forma a partire dall'anidride carbonica (CO₂) e dall'acqua (H₂O) e ha una funzione fondamentale nel mantenimento dell'equilibrio acido-base.

L'anidride carbonica, insieme ad acqua, è il prodotto terminale dell'ossidazione del glucosio, nel metabolismo aerobico. In condizioni normali, il metabolismo è in grado di neutralizzare eccessi di acidi o di basi formati nel corso dell'attività metabolica, controllando che la concentrazione degli idrogenioni (che determinano il pH ematico) sia mantenuta ad un livello costante. Il mantenimento costante del pH ematico e dunque dell'equilibrio acido-base è dovuto a tre meccanismi: i sistemi tampone, l'apparato respiratorio e l'apparato renale.

Questi sistemi permettono che non ci sia alcalosi o acidosi all'interno dell'organismo.

L'equilibrio acido-base è l'insieme dei processi fisiologici utili a mantenere il pH a valori compatibili con lo svolgimento delle principali funzioni metaboliche.

pH arterioso → 7,35-7,45

Il mantenimento di un pH entro i limiti fisiologici è fondamentale perché gli ioni H⁺ sono composti particolarmente reattivi, in particolare con le proteine.

Per questo motivo, al variare della concentrazione degli idrogenioni [H⁺] le proteine acquistano o perdono protoni con conseguenti alterazioni strutturali e **alterazioni funzionali**.

Definizione acido e base:

- **Acido:** In chimica, un acido è una molecola o ione in grado di donare uno ione idrogeno H⁺ (idrogenioni).
- **Base:** sostanza in grado di accettare idrogenioni.

Dato che la concentrazione di idrogenioni nei liquidi organici è molto bassa e varia da 1/10 milioni a 1/100 milioni di ioni nei liquidi corporei, si è preferito utilizzare l'espressione logaritmica per esprimere tale

valore. Il pH è il logaritmo negativo della concentrazione degli ioni idrogeno. Quando si parla di logaritmo negativo si deve tenere in conto che se gli idrogenioni aumentano, il pH diminuisce.

Da questa equazione appare chiaro che:

- Se la concentrazione di H^+ ioni liberi in una soluzione è alta, il pH è basso.
- Se la concentrazione di H^+ ioni liberi in una soluzione è bassa, il pH è alto.

pH DI UNA SOLUZIONE: Una soluzione avente un $pH < 7$ è *acida*. Una soluzione avente un $pH > 7$ è *alcalina*. Una soluzione avente $pH = 7$ è *neutra*.

MECCANISMI EMATICI O SISTEMI TAMPONE: mIn generale, il sistema tampone per eccellenza è **acido carbonico-bicarbonato**. In chimica si definiscono sistemi tampone le soluzioni costituite da un acido debole e dalla sua base coniugata o viceversa, capaci di limitare le variazioni della concentrazione idrogenionica. L'acido carbonico, essendo un acido debole, si dissocia parzialmente ed immette meno ioni idrogeno, mentre la dissociazione completa porta ad un'immissione di ioni idrogeno che fanno abbassare il pH. Gran parte degli acidi organici sono acidi deboli che, contrariamente agli acidi forti (come acido cloridrico e solforico), in soluzione acquosa si dissociano solo parzialmente secondo una costante k specifica per ognuno di essi, detta **costante di dissociazione**.

Per la legge di azione di massa, la costante di dissociazione di ciascun acido debole è data dal rapporto fra la concentrazione della specie dissociata $[A^-]$ moltiplicata per la concentrazione idrogenionica $[H^+]$ e la concentrazione della specie indissociata $[HA]$ dell'acido stesso.

Da cui:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$ Passando alla forma logaritmica e ricordando che il $-\log H^+ = pH$ e $-\log K_a = pK_a$, si ha: Questa è l'equazione di **Henderson e Hesselbach** e chiarisce come il pH di una soluzione dipenda dalla sua costante di dissociazione dell'acido in essa disciolto ed esprime quindi quali siano i rapporti esistenti tra pH e concentrazione della specie dissociata e indissociata in un sistema tampone.

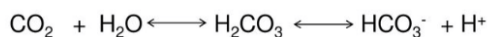
SISTEMI DI REGOLAZIONE DEL pH

Risposta immediata: I sistemi tampone si combinano istantaneamente con gli acidi o le basi in eccesso per impedire variazioni consistenti di pH.

Risposta rapida: Il centro respiratorio regola in pochi minuti la ventilazione e quindi l'eliminazione di CO_2 .

Risposta lenta: Il rene elimina dal corpo gli acidi e le basi in eccesso (giorni).

SISTEMA TAMPONE BICARBONATO/ACIDO CARBONICO



$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

Descrizione della formula: L'anidride carbonica e l'acqua formano l'acido carbonico che, a sua volta, si dissocia in ione bicarbonato e ione idrogeno.

- Il $pK = 6,1$.
- Il rapporto tra $[CO_3^-]$ e $[CO_2]$ è uguale a 20, ma facendo il logaritmo si ottiene 1,30.

Di conseguenza:

$$pH = 6,1 + 1,30 = 7,4$$

- Questo sistema è il tampone quantitativamente più importante nel liquido extracellulare.
- È un sistema aperto: le due componenti (CO_2 e HCO_3^-) sono facilmente misurabili e direttamente influenzate dai due sistemi principalmente coinvolti nella regolazione dell'equilibrio acido-base: rene e polmone.
- Mentre l'associazione dell'idrogenione con il bicarbonato avviene con estrema rapidità, la dissociazione dell'acido carbonico in anidride carbonica ed acqua richiede un tempo maggiore ($H_2CO_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$), perché si tratta di un acido debole.

REGOLAZIONE RENALE DELL'EQUILIBRIO ACIDO-BASE: In condizioni di normalità, nel sangue arterioso la quantità di HCO_3^- è di circa 24-27 mEq/L e la quantità di H_2CO_3 è di circa 1-1,5 mEq/L, con un rapporto fra esse di 20 a 1 circa. Per garantire un valore di pH normale occorre che questa proporzionalità resti costante. Tale proporzionalità è assicurata da un lato dalla funzione respiratoria che regola l'eliminazione di *anidride carbonica (meccanismo respiratorio)* e dall'altro, dai vari meccanismi messi in opera dal rene per *eliminare gli idrogenioni e riassorbire i bicarbonati HCO_3^- (meccanismi renali)*.

Qualora i polmoni non siano in grado di eliminare sufficienti quantità di CO_2 , come accade nell'ipoventilazione, l'accumulo di CO_2 nel sangue provoca un incremento dell'acido carbonico e dunque una riduzione del pH con *acidosi respiratoria*. In condizioni di iperventilazione, al contrario, la CO_2 è eliminata più rapidamente e la concentrazione di H^+ si riduce (*alcalosi respiratoria*). Un'alterazione del pH provoca una risposta dei centri del respiro che modificano la frequenza di ventilazione al fine di ristabilire un pH ematico normale.

Il ritmo della ventilazione polmonare è controllato da un centro respiratorio formato da un gruppo di neuroni posto nel midollo allungato dell'encefalo. Il centro respiratorio manda automaticamente *impulsi* al diaframma e ai muscoli intercostali attraverso diversi nervi spinali. Quando il pH del sangue si abbassa per l'aumento di CO_2 , il centro respiratorio aumenta ritmo e profondità della respirazione.

I neuroni dei centri respiratori, infatti, ricevono segnali da chemocettori sensibili alle variazioni di concentrazione dell'ossigeno, del biossido di carbonio e degli ioni idrogeno.

- I *chemocettori centrali*, posti nel midollo allungato, registrano i cambiamenti di concentrazione di CO_2 e di H^+ nel liquido cerebrospinale.
- I *chemocettori periferici (glomi aortici e carotidei)*, posti nell'arco aortico e nelle arterie carotidee, sono sensibili alle variazioni di concentrazione di CO_2 , di O_2 e di H^+ (pH) nel sangue.

L'aumento della CO_2 nel sangue con diminuzione del pH stimola i chemocettori centrali e periferici. I chemocettori centrali e periferici attivano il centro inspiratorio del midollo allungato aumentando la frequenza della respirazione (iperventilazione).

L'iperventilazione elimina con l'espirazione la CO_2 in eccesso.

I livelli di CO_2 e la $[\text{H}^+]$ nel sangue ritornano a livelli normali.

L'IMPORTANZA DEGLI ELETTROLITI: Gli elettroliti sono importanti in quanto determinano la *pressione osmotica*, come nel caso del *sodio*. Attraverso gli elettroliti viene controllata anche la *volemia* e, in questo caso, gli elettroliti coinvolti sono: *sodio, potassio, cloro e bicarbonati*. Alcuni di questi, come bicarbonati e l'acido carbonico, sono importanti anche per mantenere l'equilibrio acido-base dell'organismo.

ASSORBIMENTO DEGLI ELETTROLITI: Gli ioni come il *sodio* e il *potassio* vengono maggiormente riassorbiti in corrispondenza del tratto più vicino alla Capsula di Bowman, ossia nel **tubulo contorto prossimale** del nefrone. Per garantire l'elettroneutralità, in corrispondenza del tubulo contorto distale avviene lo scambio tra il *potassio*, lo *ione idrogeno* e lo *ione sodio*. In questi meccanismi di scambio ionico è fondamentale anche l'azione dell'*aldosterone*, nonché l'azione dell'*ormone antidiuretico atriale* la cui funzione è generare il riassorbimento dell'acqua nell'ultimo tratto del nefrone. L'*apparato iuxtaglomerulare* è costituito dalle cellule della macula densa (tessuto extratubulare posto vicino al glomerulo) e dalle cellule iuxtaglomerulari, cellule specializzate che circondano un tratto dell'*arteriola afferente*. L'apparato iuxtaglomerulare, dunque, è responsabile dell'assorbimento del sodio e quindi, implicitamente, anche dell'*acqua*. Queste cellule sono dei sensori della concentrazione del sodio e della volemia. Quindi, quando si verifica *ipovolemia*, l'arteriola afferente secerne la *renina* (enzima proteolitico rilasciato a seguito della stimolazione del sistema simpatico), la quale agisce sul suo substrato, l'*angiotensinogeno* (prodotto a livello epatico). Successivamente, l'angiotensinogeno viene convertito in *angiotensina I* che, mediante degli enzimi di *convertasi*, viene trasformata in *angiotensina II* (per eliminazione di alcuni residui amminioacidici). Infine, l'*angiotensina II* va a sollecitare la corticale del surrene per la produzione di *aldosterone*. L'aldosterone è un mineralcorticoide che agisce sull'assorbimento del sodio e di conseguenza, implicitamente, anche dell'*acqua*, così da ristabilire la pressione ematica; infatti, tutto ciò avviene quando c'è un abbassamento della pressione ematica e un abbassamento della concentrazione del sodio.

VARIAZIONI DEL PH EMATICO: Quando si verificano variazioni del pH ematico ci sono dei meccanismi, alcuni immediati e altri la cui risposta può avvenire in un intervallo più lungo (anche di uno o

due giorni), che permettono di ritornare ad una situazione di equilibrio. Una **risposta rapida** è quella dei *sistemi tampone* e del *centro respiratorio*, mentre la **risposta lenta** viene svolta dal *rene*.

I SISTEMI TAMPONE DELL'ORGANISMO: Il bicarbonato - L'acido carbonico - Alcune proteine plasmatiche – Fosfati - Lo ione ammonio

Nel caso degli ioni che hanno potere tamponante, va evidenziata la differenza tra gli ioni che circolano liberi e ioni che, invece, viaggiano complessati. Infatti, questi ultimi risultano meno attivi e proprio per questo possono fungere da tamponi, rispondendo a variazioni minime del pH.

CONTROLLO DEL PH MEDIANTE IL SISTEMA RESPIRATORIO: Anche il sistema respiratorio controlla il pH mediante **ipoventilazione** e **iperventilazione**, meccanismi mediante i quali variano le quantità di CO₂ espulsa e di CO₂ conservata nei polmoni.

- Un aumento della CO₂ nel sangue determina una riduzione del pH, quindi il pH va verso l'acidità.
- Una riduzione della CO₂ porta ad un aumento del pH che tende alla basicità.

Quindi la quantità in più o in meno dell'anidride carbonica nel sangue viene controllata mediante la ventilazione, meccanismo di correzione abbastanza rapido.

I neuroni dei centri respiratori ricevono segnali dai **chemiocettori centrali** (o bulbari, posti nell'**arco aortico** e nel **seno carotideo**) e **chemiocettori periferici** sensibili alle variazioni delle concentrazioni dell'ossigeno, degli idrogenioni e del biossido di carbonio.

Quando c'è un aumento della concentrazione di CO₂ (condizione di acidosi respiratoria con eccesso di acido carbonico) nel sangue e quindi un aumento dell'acidità del pH, vengono stimolati sia i chemiocettori centrali che periferici che mandano il segnale, attraverso i nervi, ai neuroni del centro respiratorio, che, come risposta, generano un meccanismo di respirazione profonda con un aumento della frequenza dell'atto respiratorio. Si tratta quindi di un caso di iperventilazione che elimina l'eccesso di CO₂ nel sangue.

Se non ci si trova di fronte ad un eccesso di CO₂, la risposta è molto più blanda.

DEFINIZIONE DI IPERCAPNIA E IPOCAPNIA: Esistono quindi due situazioni diametralmente opposte: l'ipercapnia respiratoria e l'ipocapnia respiratoria.

- **Ipercapnia respiratoria (acidosi respiratoria):** consiste nell'aumento nel sangue della pressione parziale di CO₂ oltre i 45 mmHg, con conseguente aumento di idrogenioni (acidosi respiratoria, condizione per cui prevalgono gli acidi nell'organismo). Questa condizione si accompagna ad *ipossia*, cioè diminuzione dell'ossigenazione del sangue. Tale situazione determina una forte stimolazione dei chemiocettori centrali e periferici che provocano iperventilazione per l'eliminazione della CO₂ in eccesso. L'ipercapnia può avere diverse cause, tra le quali l'ipoventilazione, cioè un numero insufficiente di atti respiratori a causa di una scorretta respirazione derivata da ostruzioni o malattie polmonari oppure esposizione ad ambienti con concentrazioni elevate di CO₂.

I segni e sintomi sono: Stato confusionale e disorientamento, letargia, spasmi muscolari, riduzione dell'attività cerebrale, aumento della frequenza cardiaca e fame d'aria (perché l'organismo cerca di eliminare quanto più anidride carbonica può e, allo stesso tempo, di incamerare ossigeno).

- **Ipocapnia respiratoria (alcalosi respiratoria):** consiste nella diminuzione della pressione parziale del CO₂ nel sangue al di sotto dei 40 mmHg; quindi, il pH del sangue tende alla basicità. In queste condizioni i chemiocettori sia centrali che periferici devono essere stimolati il meno possibile, perché ci si trova in una situazione diametralmente opposta rispetto all'acidosi respiratoria.

Infatti, in questa situazione i chemiocettori non inviano impulsi al centro inspiratorio, così che si verifichi un'ipoventilazione e l'atto respiratorio risulti molto più lento. In questo modo si cerca di aumentare la concentrazione di CO₂ fino ad arrivare ai suoi livelli di pressione parziale normali. La causa può essere un'iperventilazione isterica, che può portare ad uno stato di eccesso di basi e quindi ad un aumento del pH. In casi di ipocapnia può risultare utile respirare dentro un sacchetto, affinché aumenti la concentrazione di CO₂ nel sangue. I sintomi sono: Riduzione della frequenza del respiro, calo della pressione arteriosa e un aumento della frequenza cardiaca.

LA FUNZIONE DEL RENE NEL MANTENIMENTO DELL'EQUILIBRIO ACIDO-BASE: Anche il rene svolge una funzione fondamentale per la regolazione dell'equilibrio acido-base. Il rene, infatti, riassorbe il bicarbonato filtrato in corrispondenza del tubulo contorto prossimale ed effettua anche l'eliminazione di

ione idrogeno (sempre eliminato sottoforma di ione ammonio oppure unito allo ione fosfato). Il principale contributo al mantenimento dell'omeostasi acido-base da parte dei reni consiste nel recuperare gli ioni bicarbonato del filtrato glomerulare oppure eliminare l'eccesso di idrogenioni.

ACIDOSI METABOLICA E ALCALOSI METABOLICA: Così come esiste l'acidosi e l'alcalosi respiratoria, esistono anche l'acidosi metabolica e l'alcalosi metabolica, le quali non dipendono dall'atto respiratorio, ma derivano dal metabolismo cellulare oppure anche da compromissioni della funzionalità renale. L'**acidosi metabolica** corrisponde all'aumento della concentrazione degli idrogenioni nel sangue di origine extra respiratoria. Questa può essere dovuta a:

- Aumento della produzione e accumulo di idrogenioni.
- Aumento della secrezione di radicali acidi a livello renale e che di conseguenza persistono nell'organismo.
- Perdita eccessiva di radicali basici (si verifica uno squilibrio), come nel caso di un accelerato catabolismo; quindi, in questo caso l'acidosi è dovuto ad un aumento della distruzione di molecole.
- Variazioni del potassio, con un aumento di quest'ultimo a livello intracellulare e quindi fuoriuscita degli idrogenioni.

NB: Da un elevato catabolismo proteico si generano molti radicali fosforici, derivati dall'acido fosforico e che generano una immediata variazione di pH. Dal metabolismo glucidico, si generano, ad esempio, l'acido succinico, l'acido piruvico e l'acido lattico. Dal metabolismo lipidico si generano altri acidi come: l'acido pirossibutirrico, l'acetone, l'acetoacetato, l'acido acetoacetico. Situazioni di depauperamento delle macromolecole si hanno negli: stati febbrili prolungati, digiuno prolungato o diabete (l'insulina è un ormone anabolizzante per eccellenza, costruisce le macromolecole e quando manca o c'è depauperamento prevale il catabolismo). A stimolare il catabolismo ci sono anche le situazioni di tireotossicosi, l'ipertiroidismo (l'eccesso degli ormoni tiroidei provoca un'esasperazione del metabolismo) o anche una situazione di ipossia tissutale. Tutti questi sono casi in cui si può verificare l'acidosi metabolica. Quando invece, l'acidosi metabolica è dovuta ad una compromissione della funzionalità del rene, si verifica insufficiente escrezione di radicali acidi oppure una perdita eccessiva di basi dal rene.

Quando si parla di **risposte compensatorie**, la prima è sempre quella della **respirazione**, anche se si tratta di acidosi metabolica. Ad esempio, l'iperventilazione polmonare tende a ridurre l'eccesso di acido carbonico. La seconda risposta invece riguarda il **rene**. Questo, infatti, riduce l'escrezione urinaria del bicarbonato e aumenta invece l'escrezione di quegli acidi che si sono accumulati nell'organismo.

- L'**alcalosi metabolica**, invece, consegue ad un aumento della perdita degli idrogenioni e a una cresciuta ritenzione di basi nell'organismo. Questo si può verificare a seguito di vomito eccessivo oppure per aspirazione di materiale gastrico a seguito di interventi, anche diuretici protratti o in casi in cui vengono utilizzate dosi eccessive di soluzioni tampone, come il bicarbonato di sodio. Il primo meccanismo di compenso è sempre quello dei **centri respiratori**, che tendono a ridurre la respirazione per incamerare CO₂. Il secondo meccanismo di compenso è dato dal **rene** che tende a ridurre l'assorbimento dei bicarbonati e a diminuire l'eliminazione degli idrogenioni. Generalmente gli idrogenioni vengono espulsi tramite l'**ammoniaca** e i **cloruri**.

Il rene per far fronte all'alcalosi aumenta l'escrezione di bicarbonato. Si ha, quindi, un maggiore riassorbimento di HCO₃ attraverso le cellule che tappezzano il lume tubulare del tubulo contorto prossimale. Per quanto riguarda l'escrezione dei radicali acidi, la maggior parte degli idrogenioni non viene eliminata tale e quale, ma si legano a tamponi come il fosfato e l'ammoniaca. Nel caso in cui l'idrogenione si lega al radicale fosforico, forma l'acido fosforico. In altri casi, si combina con lo ione ammonio derivato dalle proteine (es. la glutammina) per formare NH₄, per poi essere escreto. Quindi, lo ione idrogeno viene escreto o sotto forma di fosfati o sottoforma di NH₄.

DOSAGGIO DEGLI ELETTROLITI: Cloro, sodio, potassio e bicarbonato fanno parte del profilo elettrolitico; quindi, si possono dosare sia nel sangue, che nelle urine, che nelle feci. La determinazione degli elettroliti fa riferimento a dei dosaggi e metodiche elettrochimiche, nonché a metodiche che usano elettrodi iono-selettivi. L'analisi viene quindi effettuata su **siero**, **plasma** o **urina**. Generalmente le differenze fra i valori degli elettroliti nel siero o nel plasma per cloro e sodio sono trascurabili. L'unica eccezione è il

potassio, in quanto è uno ione la cui concentrazione è molto alta a livello intracellulare (ciò vale anche per le piastrine e gli eritrociti). Dunque, la concentrazione di questo elettrolita varia a seconda che si prenda come riferimento il plasma o il siero. Infatti, se si attiva il processo di coagulazione la concentrazione del potassio è maggiore e ciò si può vedere solo su siero.

Se la concentrazione del potassio risultasse troppo alta ci sarebbero delle sovrastime. Ci potrebbero essere delle sovrastime anche in caso di sangue emolizzato (per un errore dell'operatore, ad esempio) che genera un fittizio incremento del potassio. Per evitare questi eventuali problemi, si analizzano le concentrazioni di potassio su plasma. La rilevazione su plasma o su sangue intero richiede l'utilizzo di provette con eparina.

Le principali cause di interferenza nella determinazione degli elettroliti sono:

- L'*emolisi*, che può causare un fittizio incremento del potassio; il soggetto non soffre di iperpotassiemia, ma il campione è stato emolizzato per un errore dell'operatore.
- La *presenza di lipidi* potrebbe interferire sulla determinazione del sodio quando si usano metodiche elettrochimiche. Al fine di evitare interferenze quando si analizza un campione iperlipidico è fondamentale centrifugare i campioni di sangue e separare il prima possibile siero e plasma anche per evitare che a seguito della centrifugazione si verifichino comunque delle interferenze lipidiche.

DOSAGGIO DEL SODIO: La determinazione del sodio si può eseguire su siero, plasma eparinato, sangue intero, sudore, urine, feci. Quando vengono analizzati i campioni di urine o feci è preferibile una raccolta temporizzata nelle 24 ore. I campioni di siero, plasma e urine possono essere conservati a 2-4 gradi oppure congelati. L'emolisi non induce variazioni del sodio, considerate le basse concentrazioni negli eritrociti, poiché è localizzato prevalentemente a livello extracellulare. Il siero lipemico, invece, può rappresentare una fonte di errore ed in tal caso occorre ultracentrifugare il siero.

DOSAGGIO DEL POTASSIO: Per quanto riguarda la determinazione del potassio ci sono delle peculiarità:

- A causa del rilascio del potassio dalle piastrine durante la coagulazione, gli intervalli di riferimento sierico sono da 0.2 a 0.5 mmol/L, maggiori di quelli del plasma e del sangue intero. L'ampiezza di concentrazione dipende dalla conta piastrinica, generalmente si va da 150 a 450 mila piastrine/ μ l. Questa variabilità rende il plasma il campione d'elezione per la determinazione del potassio.
- L'emolisi aumenta il rilascio di potassio dai globuli rossi, pertanto ciò deve essere evitato.
- Una riduzione di potassio si può osservare nei campioni di sangue intero conservati a 37 °C, che favorisce la glicolisi temporanea. Infatti, l'ingresso del potassio favorisce i processi glicolitici, che, tuttavia, termina nel momento in cui viene esaurito il potassio stesso e quindi lo ione viene rilasciato dalle cellule.

Al fine di evitare questa variabilità è bene raccogliere i campioni di sangue in provette contenenti eparina e centrifugare in modo da separare il plasma. Inoltre, è fondamentale fare la determinazione dello ione su plasma e non su siero.

DOSAGGIO DEL CLORO: La determinazione del cloro avviene nel siero, plasma, urine e nel sudore. La concentrazione nel siero e nel plasma risulta molto stabile e non è influenzata dall'emolisi, in quanto la concentrazione intra-eritrocitaria di cloro è circa la metà di quella plasmatica. Il suo dosaggio avviene con metodiche elettrochimiche o con elettrodi iono-selettivi.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO DEGLI ELETTROLITI

- Sodio sierico: 135-145 mmol/L
- Sodio urinario: 80-250 mmol/L nelle 24 ore
- Potassio sierico: 3.5-5.0 mmol/L; plasma: 3.4-4.8 mmol/L
- Potassio urinario: 25-125 mmol/24 ore
- Cloro sierico: 98-107 mmol/L
- Cloro urinario: 110-250 mmol/ nelle 24 ore

SQUILIBRI NELLA CONCENTRAZIONE DEGLI ELETTROLITI: Così come ci possono essere degli squilibri acido-base, si possono verificare anche degli squilibri nella concentrazione degli elettroliti.

SODIO: L'*iponatriemia* si verifica quando si ha una concentrazione di sodio molto bassa che, solitamente, si associa ad iposmolarità.

- Viene diagnosticata quando la concentrazione del sodio risulta inferiore a 135 mEq/L.
- Può essere di origine farmacologica (iatrogena), oppure la si ritrova nei soggetti defedati o ospedalizzati.
- Generalmente si associa ad una condizione di sodio ridotto e quindi ad un soggetto ipoidratato.
- Può essere associata anche ad una ipovolemia, quindi ad un ridotto volume ematico (es. in presenza di edema, il potassio passa prevalentemente nel compartimento extracellulare).
- Quando è presente un'insufficienza cardiaca e, quindi, un minore ritorno di sangue dalla periferia verso il cuore.
- Se il fegato non funziona bene (in caso di cirrosi epatica).
- In caso di insufficienza renale e sindrome nefrosica.

Sono associate ad *ipovolemia* tutte le iponatriemie caratterizzate da perdite gastroenteriche di sodio, da abuso di diuretici o da anche nefropatie sodio disperdente, in cui prevalentemente viene perso sodio.

Ci possono essere anche iponatriemie in condizioni di *euvolemia*, la volemia plasmatica non è così diminuita; pertanto, il volume plasmatico è in grosso modo mantenuto. In questo caso non si ha edema, ma una ritenzione di acqua libera più del normale. Questo si verifica quando c'è una ingestione di acqua superiore alla quantità di acqua che noi riusciamo a perdere con le nostre urine; infatti, c'è un bilancio a favore del mantenimento di acqua corporea rispetto a quella effettivamente eliminata. Inoltre, si verifica nell'*ipotiroidismo*, dove si ha sempre ritenzione idrica e nella sindrome da inappropriata secrezione di *ADH*, ormone antidiuretico che rende i vasi permeabili all'acqua.

1. Se l'ormone *ADH* non è presente;
2. Se non c'è equilibrio tra sintesi e rilascio;
3. Se a livello del nefrone non riesce ad esplicare le sue funzioni biologiche, in quanto ci possono essere dei recettori modificati;

Ci troviamo in una situazione di difetto di secrezione e/o di azione di *ADH* e pertanto avremo una volemia piuttosto mantenuta.

L'*ipernatriemia* si verifica in tutte quelle situazioni in cui la concentrazione del sodio supera 150 mEq/L dove vi si ha un'iperosmolarità plasmatica. Possiamo avere ipernatriemia con *ipovolemia*, cioè con abbassamento del volume ematico, come nel caso di diarrea, diuresi osmotica (per esempio nel diabete) o in caso di perdita eccessiva di componente acquosa tramite la sudorazione. Inoltre, è possibile avere una ipernatriemia con *ipervolemia*, in cui si verifica in seguito ad infusioni di soluzioni ipertoniche, come nel cloruro di sodio, dove abbiamo un eccesso di sodio. Un'ipernatriemia la possiamo osservare anche nelle situazioni di *diabete insipido centrale* e *diabete insipido nefrogeno*, in cui si ha perdita di molta acqua con le urine. Il diabete insipido è quella condizione in cui le urine non sono mielate, dovuto a un difetto dell'*ADH*; in questo caso abbiamo urina molto diluita perché i tubuli renali non riescono a trattenere acqua, in quanto *ADH* difettoso, comportandone un difetto di secrezione, ottenendo così, appunto, urine molto diluite.

POTASSIO: Ipokaliemia ed iperkaliemia indicano rispettivamente una diminuzione di concentrazione del potassio ed un'eccessiva concentrazione del potassio.

- Si definisce *ipokaliemia* una concentrazione di potassio inferiore a 3,5 mEq/L, la condizione può essere dovuta ad una ridotta assunzione di potassio o ad un eccesso di escrezione.
Dovuta, inoltre, ad uso frequente di lassativi, diarrea o ad alcalosi metaboliche, in cui si ha una perdita di potassio per ritenzione di ione bicarbonato. Si verifica, un'altra situazione in cui si ha basso contenuto di potassio, nella *Sindrome di Liddle*, sindrome rara autosomica dominante del trasporto epiteliale renale, essa dipende da un'attività intrinseca dei canali del sodio della membrana luminale nei tubuli collettori che facilitano l'assorbimento di sodio, che si scambia con il potassio; dunque, se si ha ritenzione di sodio, per un'elettroneutralità si devono perdere altri cationi, in particolare il potassio.
L'abuso di liquirizia porta ad un impoverimento di potassio, l'acido glicirrizico (principio attivo dell'estratto di liquirizia) ha un'azione simil-aldosterone, siccome aldosterone ritiene sodio ma elimina potassio.

L'*iperkaliemia* si verifica quando invece abbiamo una concentrazione superiore ai 5,5 mEq/L di potassio.

Si può verificare nel corso di emolisi, in questo caso se un'emolisi fittizia da campione non preparato correttamente oppure in condizioni di aumentato turnover, come nelle piastrinosi, in cui abbiamo una maggiore concentrazione di piastrine o in condizioni di leucocitosi in cui si ha un numero elevato di leucociti. L'iperkaliemia può dipendere anche da un'*acidosi metabolica* che implica la fuoriuscita di idrogeno dalla cellula ed ingresso di potassio; queste situazioni hanno una durata limitata, in quando subito dopo si ha un'inversione della condizione, dove il potassio fuoriesce e lo ione idrogeno entra. Può essere dovuta ad un difetto di escrezione renale cronica; un eccessivo introito alimentare; un'emolisi, come per esempio quando un soggetto soffre di una patologia emolitica; dovuta a farmaci ed iperaldosteronismo, si verifica effetto contrario della normale funzione dell'aldosterone, infatti il potassio non viene perso.

BICARBONATI: Possono essere misurati previa alcalinizzazione del campione biologico oppure misurando la quantità di anidride carbonica rilasciata dopo l'acidificazione. È possibile utilizzare sia siero che plasma eparinato. I valori normali sono: 24 mmol/L.

L'anidride carbonica se non viene determinata immediatamente, una volta che viene tolto il tappo della provetta, essa si diffonde nell'ambiente, perdendola dal campione; inoltre la determinazione deve essere fatta in maniera immediata dopo il prelievo, in quanto essa tende a ridursi fino a 6 mmol/l ad 1 ora post prelievo. La determinazione di anidride carbonica ed ossigeno viene fatta attraverso l'emogasanalisi sul sangue intero. Può essere fatta sia su sangue arterioso, senza laccio emostatico o su sangue venoso, con laccio emostatico, avendo l'accortezza di toglierlo immediatamente. Le provette in cui viene fatta contengono eparina liofilizzata, che elimina problemi legati al rapporto fra volume di sangue e volume di eparina. Inoltre, tale prelievo deve essere eseguito in condizioni di anaerobiosi, cioè in assenza di ossigeno. Oggi giorno è possibile determinare la concentrazione percentuale di ossigeno presente nel sangue attraverso dispositivi come i *saturimetri* o pulsossimetro o ossimetro; è composto da un sensore che si applica alla falange della mano, nelle dita del piede, al naso o al lobo dell'orecchio ed attraverso una sonda avviene l'elaborazione dei dati. Il principio di funzionamento di un saturimetro si basa su una sonda che genera dei fasci di luce nel campo del rosso e dell'infrarosso, questi fasci attraversano la cute ed i vasi intercettando l'emoglobina sia quella ossigenata che quella non ossigenata, fino ad arrivare ad una fotocellula. Le radiazioni luminose vengono assorbite dall'emoglobina e a questo punto si fa una differenza di assorbimento fra l'emoglobina legata all'ossigeno e quella non legata, misurando la differenza tra le radiazioni emessa dai diodi e quella finale rilevata dalla fotocellula si è in grado di determinare l'ossigenazione sanguigna. Generalmente, i range di normalità di saturazione di ossigeno devono essere compresi tra il 97-99%; i valori compresi tra 91% e 94% indicano ipossia lieve, invece valori compresi tra 86%-91% indicano ipossia moderata e al di sotto del 85 % ipossia grave.

ELETTROFORESI PROTEICA: È una metodica che consente di separare le proteine in base alla loro: *Massa - Carica elettrica*

Qual è il senso di separare le proteine? Fisiologicamente le proteine sono presenti in proporzioni specifiche, dunque una variazione delle proporzioni può dare informazioni rilevanti rispetto alle possibili patologie.

Le proteine sottoposte ad elettroforesi si muovono in modo differente, in particolare quelle più leggere sono più veloci e, al contrario, quelle più pesanti sono più lente. Quindi la velocità è influenzata dalla **massa**.

A parità di massa, però, è necessario considerare la **carica elettrica**, poiché il "motore" della corsa è proprio un campo elettrico. La carica elettrica che ostacola il percorso della proteina può essere determinante.

Supponendo di procurarsi il materiale per un'elettroforesi (*Supporto, pezzo di carta, pezzo di plastica, gel di agarosio, ecc.*) e, una volta sistemato l'occorrente, di porgiarci una goccia di siero, si dovrà considerare che:

- Il siero sarà sottoposto ad un campo elettrico, quindi a separazione.
- Saranno visibili due tracciati (nell'immagine sono due tracciati fisiologici, dove 2-3 è l'estremo iniziale e la goccia si muove verso l'estremo opposto).
- In base alla densità della macchia formata, si conosce approssimativamente la quantità della proteina presa in considerazione.

Le proteine vicine sono tutte uguali, in base alla densità la proteina ha degli impulsi che le permettono di fermarsi insieme alle proteine uguali ad essa e di creare questo tipo di grafico.

TRACCIATO FISILOGICO: In generale, in un grafico, più una campana è alta e stretta alla base, più le componenti descritte dalla curva sono simili. Nel grafico, infatti, l'albumina è rappresentata dal picco più

alto e stretto, poiché composta da componenti simili. Seguono poi le curve che rappresentano le proteine $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ .

ALFA 1 ($\alpha 1$)

La frazione $\alpha 1$ comprende l' **$\alpha 1$ -antitripsina**, una proteina enzimatica che tende a controllare l'eccesso di cartilagine nell'organismo.

Aumento:

- **Fase acuta dell'inflammazione:** quando si va incontro ad un'inflammazione, l'organismo risponde con l'aumento di proteine. Queste giocano un ruolo fondamentale, poiché sono coinvolte nell'innescare dell'attivazione dell'immunità stessa.

Diminuzione:

- **Carenza genetica o acquisita da epatopatia di $\alpha 1$ -antitripsina:** carenze genetiche di questa proteina possono portare allo sviluppo di fibrosi polmonare, in cui il polmone perde l'elasticità. La carenza genetica si manifesta in età infantile, mentre la carenza acquisita dipende dalla riduzione della funzionalità del fegato e può insorgere in età diverse. Nel grafico questa alterazione sarà rappresentata da una riduzione della gobba della frazione $\alpha 1$.

ALFA 2 ($\alpha 2$)

Aumento:

- **Fase acuta dell'inflammazione.**
- **Sindrome nefrosica:** quando la funzionalità del rene è ridotta, le proteine a livello renale non vengono riassorbite. Questo induce il fegato a produrne in quantità maggiore con conseguente aumento della frazione proteica specifica.

Diminuzione:

- **Carenza di $\alpha 2$ -macroglobulina e aptoglobina in corso di anemie emolitiche:** L' $\alpha 2$ -macroglobulina è una delle proteine dell'inflammazione. La frazione $\alpha 2$ comprende anche l'**aptoglobina**, proteina coinvolta nel recupero del ferro. Nel meccanismo di recupero del ferro sono coinvolte anche la **ferritina**, che costituisce il deposito di ferro, e la **transferrina**, che invece costituisce il trasporto. L'aptoglobina recupera il ferro che viene perso dal globulo rosso quando questo è vecchio o danneggiato (se la rottura del globulo rosso è fisiologica avviene dopo 120 giorni, altrimenti prima). Quando l'aptoglobina è impegnata nella cattura del ferro viene consumata, di conseguenza si ha una diminuzione della frazione $\alpha 2$. L'aptoglobina è legata all'**anemia emolitica**, poiché interviene quando vi è la rottura del globulo rosso.

BETA 1 (β)

Aumento:

- **Fase acuta dell'inflammazione.**
- **Transferrina** → **anemie sideropeniche**.
- **β -lipoproteina (ApoB)** → **ipercolesterolemia**.
- **Gammopatia monoclonale**.

Diminuzione:

- **Malnutrizione - Sofferenza epatica - Danno renale, ecc.**

Esempio: Una donna in età fertile che mangia poca carne e ha un ciclo mestruale abbondante potrà presentare dei quadri differenti che dipendono dal tempo di insorgenza della condizione (**anemia sideropenica**):

- Se la condizione dura da più di tre mesi: Nella fase iniziale l'organismo reagisce con un aumento della transferrina, quindi un aumento del trasporto con lo scopo di ottenere più ferro. Questo compensamento è limitato e va avanti finché si avrà abbastanza ferro.
- Se la condizione dura da un anno: Si potrà osservare un'emoglobina bassa, ferro basso, ferritina bassa e transferrina bassa.

Quindi → trovare valori alti di transferrina e valori ridotti delle altre componenti indica un'insorgenza recente di anemia, mentre un valore ridotto della transferrina indica una condizione che va avanti da più tempo.

Esempio: Un valore della ferritina basso con altri valori normali vuol dire che l'organismo sta utilizzando tutto il ferro a disposizione per creare una situazione fisiologica, ma non riesce a mettere delle scorte da parte. Non è patologico, a meno che non sorgano altre patologie che intaccano il ferro.

Esempio: Gli alcolisti, facendo uso di alcool, sono soggetti ad un'inflammatione cronica dell'intestino che non permette loro di assorbire nutrienti in quanto la mucosa è piatta e sottile.

Nel metabolismo del ferro intervengono dei cofattori: **B12** e **folati**.

Gli alcolisti hanno carenze marcatissime di questi cofattori.

Con carenza di **B12** i globuli rossi diventano molto grandi, mentre con carenza di ferro diventano molto piccoli. Per capire se è un problema di assunzione e quale sostanza manca, la singola valutazione di ferro e transferrina non è sufficiente. Non sempre condizioni momentanee di carenze sono patologiche, **si considera patologica una condizione in cui si è sempre in debito**.

L'emolisi del campione intacca i risultati della quantità di ferro? L'effetto dell'emolisi è relativo, intacca moltissimi analiti ma non il ferro, perché la cattura del ferro da parte dell'aptoglobina inizia in un periodo di tempo più lungo; quindi, può modificare il risultato in minima parte.

BETA 2 (β_2)

Nella zona beta sono comprese anche le beta lipoproteine, coinvolte nel metabolismo del colesterolo. Nelle proteine β_2 è compresa anche la frazione C3 del complemento, ovvero una frazione proteica che, insieme ad altre proteine, contribuisce all'innescare dell'immunità.

Aumento:

- *Frazione C3 del complemento* → fase acuta dell'inflammatione.
- *Gammopatia monoclonale*.

Diminuzione:

- *Frazione C3 del complemento* → condizioni di consumo del complemento (m. autoimmuni; campione non fresco)

Il quadro proteico delle proteine precedenti ci interessa principalmente per poter escludere le **gammopatie**, ovvero le patologie della componente gamma.

GAMMA (γ)

Aumento:

- *Inflammatione cronica - Malattie autoimmuni - Epatopatie - Infezioni - Immunizzazioni recenti - Tumori - Linfomi - Gammopatie monoclonali*.

Quando si ha un aumento della frazione gamma non si tratta sempre di gammopatie; quindi, è necessario capire quando si tratta di un aumento monoclonale.

Diminuzione:

- *Ipogammaglobulinemia*.

Nelle urine non devono esserci proteine.

Il quadro sieroproteico in passato permetteva di fare diagnosi, ma attualmente diventa superfluo, in quanto è possibile effettuare i dosaggi singoli.

Frazione gamma alta: la gobba a livello della frazione gamma viene chiamata **ponte beta-gamma**, in quanto tra queste due frazioni non è presente la gobba.

Si tratta di un quadro appartenente alla medicina interna → sindrome nefrosica importante.

Il problema da porsi in questo caso, è capire se è presente una **componente monoclonale**.

Il quadro elettroforetico serve per una in particolare: la gammopatia monoclonale. Nella zona gamma si troveranno le gammaglobuline, ovvero gli anticorpi.

Le componenti monoclonali sono un'eccessiva produzione di anticorpi tutti uguali, ma la forza immunologica risiede nella diversità di queste componenti, poiché più si possiedono anticorpi diversi, più si è protetti. Per produrre anticorpi, all'organismo servono molte risorse. Nelle **gammopatie**, tutte le risorse

vengono investite per produrre anticorpi uguali, riducendo così le risorse per la produzione di anticorpi diversi.

GAMMOPATIA MONOCLONALE: Accumulo di una proteina anomala nel sangue e nel midollo osseo; può essere associata a malattie autoimmuni o infezioni. Non è cancro. Può evolvere in mieloma/linfoma.

Tramite analisi del sangue è possibile trovare la componente monoclonale interessata e monitorarla nel tempo. Questa patologia è asintomatica, infatti il quadro sieroproteico serve per identificare componenti monoclonali.

- **Condizione fisiologica:** All'incontro con l'antigene, il linfocita B si differenzia in plasmacellula ed inizia a produrre anticorpi. Gli anticorpi prodotti sono completi.
- **Amiloidosi AL:** In questo caso gli anticorpi si presentano in forme subdole non riconoscibili, con quadri sieroproteici apparentemente normali. Questo tipo di anticorpi, essendo molto piccoli, non si accumulano nel sangue (di conseguenza il quadro siero proteico risulta fisiologico), ma si perdono nelle urine. Il paziente è esposto a molteplici malattie, poiché gli anticorpi non funzionano in modo adeguato. Questa condizione è chiamata **micromieloma**.

La componente monoclonale deve essere sorvegliata, ma non è detto che evolva in cancro. In quest'ultimo caso può diventare un **mieloma** o un **plasmocitoma**.

- Il **mieloma** è una neoplasia plasmacellulare ematologica che interessa di tipi di plasmacellule deformi, che per crescere utilizzano componenti del sistema immunitario. Il mieloma è una neoplasia che può essere curata, con un'aspettativa di vita che negli ultimi anni è aumentata da 15 a circa 25 anni.
È una neoplasia maligna che interessa più punti del midollo.
- Anche il **plasmocitoma** è una neoplasia maligna, ma al contrario del mieloma è concentrato in un solo punto del midollo.

Le terapie in entrambi i casi non sono chirurgiche, ma chemioterapiche! I pazienti trattati con queste terapie chemioterapiche devono vivere in un ambiente completamente sterile, perché sono sottoposti a molti rischi infettivi. Attualmente si utilizza anche l'autotrapianto, con cellule sane del paziente che vengono coltivate e successivamente iniettate.

I MARCATORI TUMORALI: RUOLO ED UTILIZZO: I marcatori tumorali vengono utilizzati per il monitoraggio del paziente, per individuare eventuali recidive; viste le conoscenze della cellula tumorale sono aumentati i marcatori che caratterizzano il tessuto neoplastico e che ci permettono di utilizzarli come:

- **Marcatori prognostici**, sono in grado di stabilire la prognosi di una determinata malattia, ma soprattutto sono tantissimi e largamente utilizzati (ne escono di nuovi continuamente).
- **Marcatori predittivi**, permettono di stabilire quella che può essere una terapia più mirata rispetto a un determinato tumore.

Il marcatore in generale potrebbe essere utilizzato per la diagnosi precoce, ma ancora c'è molto da fare; siamo tuttavia arrivati ad una *caratterizzazione biologica del tumore* che permette di poterli trattare in maniera più specifica, con una cosiddetta medicina più personalizzata, che ha reso alcune forme tumorali un po' come patologie croniche.

Le alterazioni che caratterizzano le cellule tumorali trovano un loro corrispettivo sia in **alterazioni morfologiche**, quindi che riguardano la struttura della massa tumorale, che in **alterazioni biochimiche**, che determinano l'alterata presenza di molecole, che chiamiamo **marcatori tumorali**.

Queste stesse molecole possono essere rilevate:

- Direttamente sul **tessuto neoplastico**.
- Nei **fluidi** dell'organismo, quindi queste sostanze biochimiche indotte dalla presenza della cellula neoplastica vengono riversate nei fluidi biologici (per cui possono essere dosati a livello del sangue, nelle urine, nel liquido per esempio pleurico e nel liquido ascitico).

Queste molecole, che rappresentano allora il *marcatore tumorale*, sono prodotte:

- Direttamente dalle **cellule neoplastiche**, quindi sono sostanze liberate dalla presenza della cellula tumorale che vengono immesse in circolo.
- Possono essere anche molecole indotte dalla risposta dell'organismo al tumore in seguito all'interazione tumore–ospite.

Che cosa è un marcatore tumorale? Un marcatore tumorale può essere definito come un segnale biochimico correlato alla presenza di una neoplasia e che è possibile misurare a distanza dalla sede del tumore; quindi, un marcatore è una sostanza che noi usiamo nel sangue, principalmente, che ci permette di indicare quale forma di tumore è presente nell'organismo. In particolare, una definizione storica che risale al 1985 di *biomarcatore di neoplasia* è quella che definisce come biomarcatore una sostanza misurabile quantitativamente, con metodi biochimici o immunochimici (ad oggi con tanti altri metodi), nei tessuti e nei liquidi corporei, per:

- Identificare la presenza di una determinata neoplasia.
- Possibilmente identificare quella che è la sede in cui tale neoplasia si è sviluppata.
- Stabilire l'entità prima del trattamento terapeutico.

Come possono essere classificati i marcatori tumorali? Non esiste un unico modo di classificazione dei marcatori tumorali, ma faremo riferimento alla seguente classificazione. Classificazione storica che riprende quello che è il **criterio anagrafico**, ossia sulla base di come sono stati identificati i vari marcatori tumorali. Il primo marcatore, per eccellenza tumorale, risale al 1846 ed è rappresentato dalla proteina di *Bence Jones* che costituisce il marcatore del mieloma multiplo. Successivamente sono passati un pò di anni per identificarne degli altri, proprio quando le conoscenze relative ai tumori aumentarono, stiamo parlando del 1960 circa.

Questo accade quando venne fuori il concetto di antigene - tumore associato, e in questo periodo che vengono individuati altri marcatori (associati a diversi tipi di neoplasie) come:

- Il **TPA** (1957).
- L'**alpha-fetoproteina** (1963).
- Il **CEA** (1965) ancora oggi utilizzato.

Andando avanti con le nuove conoscenze sulla patogenesi dei processi neoplastici sono entrate a far parte anche dei marcatori tumorali, per esempio alcuni *oncogeni*, *oncosoppressori*, *fattori di crescita*, tipo il *VEGF*, il *PSA* individuato nel 1979 che rappresenta il marcatore principale del carcinoma prostatico, il *p53*; infine, intorno 1990 si è arrivati all'identificazione del *HER-2/neu*, marcatore per carcinoma della mammella, ed oggi utilizzato per la target therapy in quanto esiste una terapia specifica per gli HER-2 positivi. Grazie alle conoscenze genetiche, siamo arrivati all'identificazione di altri geni come il *BRCA1* e *BRCA2*, legati al carcinoma mammario, ovario, della prostata legati ai carcinomi di tipo ereditario. Oggi siamo nell'era post-genomica proteomica.

Ulteriore tipo di criterio per analisi dei marcatori tumorali è il **criterio topografico**, che suddivide i marcatori tumorali in due classi:

- **Markers circolanti**: marcatori misurabili con il prelievo di un liquido biologico (sangue in primis); essi sono facilmente accessibili, ripetibili nel tempo e sono alla portata di ogni laboratorio. Questo può essere utilizzato per avere un quadro completo del decorso di una determinata neoplasia.
- **Markers tissutali**: marcatori misurabili in seguito a prelievo di un campione di un tessuto, pertanto non possono essere utilizzati per una diagnosi precoce, in quanto il tessuto è già di tipo neoplastico. Danno informazioni importanti per la caratterizzazione del tumore, intervenendo in maniera terapeutica mirata. Non sono ripetibili nel tempo, quindi riusciamo a dosarli in quel determinato momento, ma sapendo che i tumori sono fortemente eterogenei mutano nel tempo, e prevedono tecniche di identificazioni più complesse, non alla portata di tutti i laboratori.

I marcatori tissutali vengono suddivisi ulteriormente in: *Membrana, Citoplasmatici & Nucleari*

Un altro metodo per classificare i marcatori tumorali è il cosiddetto **criterio bio-funzionale**, ossia vengono classificati i marcatori a seconda delle loro caratteristiche biologiche oppure delle loro funzioni, per cui

possiamo avere come marcatori: *antigeni, immunoglobuline, enzimi, proteine, ormoni, mucine, citocheratine, recettori, fattori di crescita, oncogeni e oncosoppressori*.

Altra classificazione largamente utilizzata per classificare i marcatori tumorali è il ***criterio della specificità tissutale***, nel senso che per ogni tipo di tumore sono identificati alcuni marcatori, che sono collegabili a quella determinata neoplasia; però alcuni marcatori possono essere contemporaneamente presenti per più forme di neoplasia, come per esempio il CEA che può essere utilizzato per il colon, il pancreas, la mammella, lo stomaco, il polmone e l'ovaio, quindi perde un po' della sua specificità, nel senso che non è sicuramente tumore specifico; in alcuni casi esistono poi dei marcatori specifici per una determinata neoplasia.

Un altro criterio di classificazione è il ***criterio patogenetico***, criterio in cui si ripercorre quella che è la storia che ha portato alla formazione del tumore e con eventi metastatici. Perciò, in base alle fasi in cui si interviene è possibile andare a rilevare diversi tipi di marcatori:

- Quelli che intervengono nella fase iniziale, dove si hanno processi di danno al DNA.
- Eventuali riduzioni, per esempio di oncogeni ed oncosoppressori.
- Marcatori che intervengono nella fase dell'espansione clonale, in cui si hanno delle modifiche tecnologiche e funzionali, che portano alla liberazione di alcune sostanze in circolo collegate proprio alla presenza del tumore.
- Infine, marcatori che sono legati alla progressione tumorale e quindi che si utilizzano in una fase ancora più avanzata.

Quali sono le condizioni che caratterizzano lo sviluppo del carcinoma? È processo complesso, non ancora ben conosciuto nonostante si sa molto di più rispetto al passato. Su una cellula normale hanno influenza:

- *Fattori genetici*, che predispongono un inizio di un processo neoplastico.
- *Fattori ambientali*, che rappresentano il fattore di rischio, che variano a seconda del tipo di tumore.
- *Fattori comuni* per molti tipi di tumore; per esempio, il fumo di sigaretta è un fattore di rischio per organi come il polmone, la vescica, e altri.
- *Fattori ben precisi* che caratterizzano un tipo specifico di tumore.

La cellula tumorale è caratterizzata dalla completa perdita della regolazione. I due aspetti principali delle cellule neoplastiche sono:

- La ***proliferazione cellulare rapida***, quindi le cellule proliferano velocemente e senza controllo; ciò comporta l'aumento della concentrazione di proteine e altri metaboliti nel sangue che normalmente non devono essere presenti. Questi metaboliti possono quindi essere utilizzati come marcatori tumorali.
- La ***sdifferenziazione***, che comporta la liberazione di proteine carcino-embryonarie, marcatori ectopici ed enzimi proteolitici. Anche queste molecole possono essere utilizzate come marcatori tumorali.

PROCESSO METASTATICO: In una prima fase del tumore si ha un'***espansione clonale***, ma se non si interviene precocemente, si verifica una progressione tumorale, ossia un ***processo neoplastico***. Il processo neoplastico si basa su:

1. ***Sviluppo locale del tumore e diffusione nell'ambiente circostante***, con modificazioni sostanziali del tessuto coinvolto. Si verifica la formazione del mesenchima-transition, che presenta cellule neoplastiche con, quindi, alterazioni morfologiche.
2. Si verifica, in secondo luogo, l'***invasione (invasion)*** sia dei vasi sanguigni che dei vasi linfatici. In questo modo la cellula neoplastica entra in circolo.
3. Si ha poi un ***passaggio, attraverso i vasi, delle cellule tumorali*** a distanza e in altri tessuti.
4. Si verifica poi l'***extravasation***, cioè il passaggio delle cellule ad altri tessuti. Quindi si verifica l'impianto e la proliferazione anche in altri tessuti.

Queste sono le fasi che danno inizio al processo metastatico con interessamento di vari organi e tessuti in base al tipo di tumore e rispetto alla sede iniziale da cui esso è partito.

BLACK BOX E OPEN BOX: In passato, la cellula tumorale rappresentava una "scatola nera", perché si sapeva molto poco su di essa e su come si potesse intervenire per evitare la progressiva crescita del tumore.

Nel corso degli anni, si è arrivato a considerare la cellula tumorale come una “open box”, e sebbene ancora non si riesca completamente a battere e dominare il tumore, sicuramente si conoscono i meccanismi che caratterizzano le cellule neoplastiche.

HALLMARKS OF CANCER: Si conoscono molti dei segnali intracellulari che vengono attivati, ma si conoscono anche i cambiamenti dell’ambiente circostante alle cellule tumorali. Già nel 2000, sono stati identificati gli “*Hallmarks of Cancer*”, cioè le caratteristiche principali che identificano le cellule neoplastiche.

Tra queste troviamo:

- I “*signaling*” che permettono la proliferazione incontrollata.
- Gli “*Evading growth suppressors*”.
- Tutti i fattori che portano all’attivazione dell’invasione e della metastasi, “*Activating invasion and metastasis*”.
- “*Enabling replicative immortality*”.
- “*Inducing angiogenesis*”, le cellule tumorali sono altamente vascolarizzate, perché inducono la formazione di nuovi vasi.
- Resistenza alla “*cell death*”, cioè si verificano condizioni tali per cui le cellule tumorali risultano resistenti alla morte; quindi, tendono a proliferare sempre di più e ad aumentare la dimensione del tumore.

Gli “Hallmarks of Cancer” sono stati implementati nel 2011. Gli hallmarks aggiunti sono stati chiamati “*Emerging Hallmarks of Cancer*”.

Sono state identificate altre quattro caratteristiche della cellula tumorale, che potrebbero risultare fondamentali nella patogenesi tumorale, ma anche per identificare nuovi target terapeutici:

- “*Genome instability and mutation*”.
- “*Deregulation cellular energetics*”, infatti un ruolo fondamentale per la sopravvivenza delle cellule tumorali è il loro metabolismo energetico, che risulta completamente alterato rispetto alla cellula normale.
- “*Avoiding Immune destruction*”, si verificano delle alterazioni del sistema immunitario che evitano la distruzione delle cellule tumorali. Anche su questo campo sono stati effettuati notevoli progressi, infatti, oggi si parla sempre di più di immunoterapia (terapia di frontiera nella cura del cancro).
- “*Tumor-promoting Inflammation*”, si è visto che a livello del tessuto colpito dal tumore si verifica un’inflammation cronica. Anche questo processo infiammatorio, durante la cura, deve essere bloccato.

Questi quattro caratteri hanno aiutato ad aumentare le conoscenze sulle cellule tumorali.

IL MICROAMBIENTE TUMORALE: Il “*Tumor Microenvironment*” è l’insieme di cellule che circondano il core del tessuto neoplastico, cioè le cellule epiteliali. Si è visto che svolgono un ruolo fondamentale nel supportare il processo neoplastico. Si è visto che l’interazione tra le cellule tumorali e il microambiente tumorale reciproca, supporta ancora di più il processo neoplastico.

Quali sono le cellule che caratterizzano il tumore? Il microambiente varia in base al tumore, ma comunque troviamo: adipociti, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule del sistema immunitario. I fibroblasti, tramite la liberazione di fattori di diverso tipo, supportano la crescita tumorale. Contemporaneamente le cellule tumorali portano a delle alterazioni morfologiche e funzionali dei fibroblasti (*CAF= Cancer-Associated Fibroblast*). Anche gli adipociti vanno incontro a modifiche per supportare la crescita tumorale (*Cancer-Associated Adipocytes*). *Endothelial Cell* e *Immune Inflammatory Cells* contribuiscono alla progressione del tumore. La conoscenza del microambiente ha portato gli scienziati a focalizzarsi, non solo sulle cellule epiteliali e del microambiente del tumore, ma anche di bloccare questo rapporto bidirezionale tra loro a scopo terapeutico.

IL CRITERIO PATOGENETICO: I marcatori che possono essere utilizzati per identificare un tumore sono:

- Geni di diverso tipo (oncogeni, oncosoppressori, geni coinvolti nei processi apoptotici).

- Macromolecole che intervengono durante i processi di replicazione, con la liberazione di sostanze che diventano markers.
- Molto utilizzate sono le **citocheratine mucine**, che intervengono nella fase finale, cioè quando il tumore è in metastasi. Le citocheratine mucine vengono valutate per individuare la terapia da adottare.

IL CRITERIO DELL'UTILITÀ CLINICA: In questo caso, i marcatori vengono classificati in:

- **Marcatori efficaci**, quando un marker è associato con un dato processo biologico e, tale processo biologico, è associato con un dato comportamento clinico.
- **Marcatori utili**, quando un marker ha un impatto favorevole su end point clinici (mortalità, intervallo libero di malattia, qualità di vita, compliance, ecc.).

Un marcatore, per poter essere utilizzato nella pratica clinica, deve presentare delle caratteristiche:

- **Deve essere adatto per lo screening**, così che il tumore si possa individuare prima della comparsa di segni e sintomi. Lo scopo della ricerca è quella di individuare sempre più sostanze che portino all'identificazione del tumore durante gli screening, così da intervenire precocemente.
- **Diagnosi**, infatti un marcatore deve poter essere utilizzato in fase diagnostica. Quanto più la diagnosi è precoce, tanto più aumenta la sopravvivenza.
- Attraverso il dosaggio dei marcatori si può **monitorare lo sviluppo del tumore** e anche la risposta al trattamento terapeutico (chirurgico o farmacologico effettuato).
- Sono necessari anche per identificare precocemente delle **recidive**.
- Utili per la **prognosi**.

IL MARCATORE IDEALE NON ESISTE: Un marcatore ideale che presenti tutte queste caratteristiche, in realtà, non esiste. Un marcatore ideale, infatti, deve permettere:

- Una diagnosi precoce.
- Un dosaggio altamente specifico mediante test per identificare solo quel tipo di marcatore.
- Deve permettere l'identificazione, la localizzazione e la natura del tumore (attualmente alcuni marcatori sono comuni a più forme di tumore, non sono quindi altamente specifici).
- Il test deve essere di facile esecuzione.
- Avere un costo contenuto.

INCREMENTI NON SPECIFICI: Un marcatore ideale non esiste nemmeno a causa di incrementi non specifici, cioè eventi fisiologici e abitudini voluttuarie, patologie non tumorali e manovre diagnostiche, chirurgiche, chemioterapiche in sede tumorale, che comportano un aumento di questi marker tumorali senza che vi sia la presenza del tumore. Ciò si verifica perché la maggior parte delle sostanze che si utilizzano come marker tumorali, in realtà, non vengono prodotti solo dalla cellula neoplastica, ma possono aumentare in corso di una neoplasia, non sono così specifiche da essere legate solo al tumore. Altre patologie possono portare all'aumento di questi marker, ad esempio:

- La **tireoglobulina** (marcatore per i tumori della tiroide) è una glicoproteina contenuta nelle cellule follicolari della tiroide normalmente. La tireoglobulina non aumenta solo in caso di tumore alla tiroide; infatti, basta avere il gozzo (dovuto ad un aumento dell'attività della tiroide), per avere un aumento di questo marker. Anche nella **tireotossicosi** si verifica un aumento della tireoglobulina. Dunque, questa glicoproteina non può essere utilizzata come marker specifico per diagnosticare il tumore alla tiroide.

ESEMPI DI INCREMENTI NON SPECIFICI: Gli incrementi non specifici possono essere ricondotti a fenomeni fisiologici e abitudini di vita.

Abitudini voluttuarie:

- Il fumo, in questo caso il marker non specifico è il CA 125 che può essere prelevato in un fumatore e non in un non-fumatore.
- L'alcool porta all'aumento dei marker non specifici CEA e TPA.

Condizioni fisiologiche che comportano un aumento dei marcatori sono:

- Allattamento, marker MCA.
- Ciclo mestruale, marker CA 125 (marker usato per il carcinoma ovarico).
- Gravidanza, markers AFP, TPA, CEA, CA 125, MCA, B-Hcg.

INCREMENTI DOVUTI AD ALTRE PATOLOGIE: Un altro problema è che l'aumento di molti marcatori biologici sia spesso dovuto ad altre patologie.

NB: il PSA è il marker specifico per il carcinoma della prostata. Esso è tessuto-specifico, ma non tumore specifico. Questo, infatti, viene prodotto a livello della prostata, ma potrebbe aumentare a causa di una semplice ipertrofia prostatica o ad un processo flogistico (prostatite). Il suo dosaggio viene impiegato nello screening del carcinoma prostatico con degli accorgimenti, ad esempio: si considera il PSA libero rispetto a quello totale. Ovviamente anche in base ai valori ottenuti, si valuta la possibile presenza o meno di neoplasia. Un altro esempio, in questo caso nella donna, è l'endometriosi che si accompagna ad un aumento del CA 125, il marker aspecifico del tumore ovarico.

INCREMENTI DOVUTI ALLE MANOVRE DIAGNOSTICHE: Anche le manovre diagnostiche possono comportare un aumento del marker. Una delle difficoltà maggiori dell'impiego clinico dei marcatori tumorali si incontra nella definizione dei "valori normali", nel senso che non è facile stabilire il "valore di cut-off" (= Valore di Soglia Superiore). Quando si vanno a dosare dei marcatori, il test può risultare positivo o negativo rispetto al valore soglia stabilito. Tuttavia, bisogna prestare attenzione ai risultati ottenuti per determinare se un soggetto presenta o meno la malattia.

Si possono ottenere:

- **Test positivo con veri positivi**, in questo caso alla positività al test corrisponde un soggetto che realmente presenta la malattia.
- **Test negativo con veri negativi**, in questo caso alla negatività al test corrisponde un soggetto con malattia assente.
- **Test positivo con falsi positivi**, in questo caso si ha positività al test, ma assenza di malattia (non ci si trova di fronte ad un processo neoplastico).
- **Test negativo con falsi negativi**, in questo caso il test è negativo, ma il soggetto è affetto dalla malattia.

Test ideale → non c'è sovrapposizione tra le due popolazioni, sani e malati.

Tutti i soggetti sani hanno un test negativo e tutti i soggetti malati hanno un test positivo.

- **Specificità** = dosa in maniera esclusiva un determinato marcatore.
- **Sensibilità** = riesce a rilevare anche la più piccola quantità di sostanza presente.

Sarebbe facile, in tale ipotesi, determinare il valore di cut-off per discriminare con precisione le due popolazioni. Nella realtà il test ideale non esiste!

Test reale → si verifica sempre una sovrapposizione più o meno ampia delle due distribuzioni. È impossibile individuare sull'asse delle ascisse un valore di cut-off che consenta una classificazione perfetta, ossia tale da azzerare sia i falsi positivi che i falsi negativi.

CRITICITÀ

- **Falsi negativi:** valori di marcatore tumorale negativi che non escludono la presenza di un tumore.

Il risultato del marcatore deve essere sempre interpretato in quella che è la storia clinica del paziente, inoltre deve essere supportato da esami strumentali e diagnostici che sostengono quell'ipotesi.

Possibili cause: - Tumore molto piccolo - Tumore poco vascolarizzato - Prevalenza nel tumore di cellule che non rilasciano il marcatore - Farmaci - Interferenze nel dosaggio

- **Falsi positivi:** valori elevati di marcatore possono essere ritrovati in assenza di tumore.

Quindi, anche un risultato positivo ed elevato necessita di essere interpretato con molta cautela prima di associarlo ad un determinato tumore.

Possibili cause: - Eventi fisiologici (ciclo mestruale, gravidanza) e abitudini voluttuarie (fumo, alcol) - Patologie non tumorali - Procedure diagnostico-terapeutiche - Interventi chirurgici – Farmaci - Obesità - Alterata funzionalità renale

LIVELLI DECISIONALI

- **Normalità:** È il classico valore soglia, calcolato sulla base della distribuzione dei valori di un dato marcatore in soggetti sani.
- **Patologia:** Livello più elevato di normalità. Valori superiori a questo livello dovrebbero indicare con molta probabilità la presenza di una condizione patologica, benigna o maligna.

Al di sotto del valore il test si considera negativo, al di sopra si considera positivo al determinato marcatore.

CLASSIFICAZIONE DEI MARCATORI

1. **Marcatori di prima scelta:** marcatori sicuramente utili per i quali esiste una solida letteratura biologica e clinica, tale da garantire all'utilizzo routinario un rapporto costo/risultato favorevole.
2. **Marcatori di seconda scelta:** probabilmente utili, ad una letteratura biologica consolidata non fa riscontro una verifica clinica definitiva del rapporto costo/risultato.
3. **Marcatori affini:** un gran numero di marcatori appartengono a “famiglie” che dovrebbero avere prestazioni simili (marcatori mucinici citocheratinici). Il dosaggio di uno o dell'altro ha lo stesso significato.

Spesso si dosano più marcatori per un tipo di tumore, quando hanno lo stesso significato come i marcatori di seconda scelta o i marcatori affini non ha senso andare a dosare più tipi di marcatori, ma basta dosare un marcatore di prima scelta. In alcuni tipi particolari di tumori, la presenza di due marcatori può essere utile, ma sono casi molto rari. In generale, dunque, si preferisce il dosaggio dei marcatori di prima scelta, e, se non se ne ha la possibilità, si passa alle altre due opzioni.

Per alcuni casi può bastare un solo marcatore, ad esempio nel carcinoma ovarico è stato constatato che al CA 125 (marcatore tumorale oggi in uso per il carcinoma ovarico) si può associare un altro tipo di marcatore, l'He4, che fornisce informazioni aggiuntive. Molti dei marcatori circolanti che vengono studiati non si utilizzano nella fase di diagnosi, ma in quella di monitoraggio, dunque una fase più avanzata. Negli altri casi si utilizzano marcatori di prima scelta o, al massimo, due marcatori accoppiati.

Per alcuni tipi di tumori esistono dei marcatori specifici che permettono di effettuare lo screening, ad esempio per il carcinoma della cervice uterina. Per il carcinoma alla mammella lo screening non è basato sui marcatori tumorali, ma si effettua la mammografia, mentre nel caso del carcinoma della cervice si utilizza il marcatore per l'HPV, perché si è visto che alcuni ceppi dell'HPV aumentano il rischio di sviluppare questo tipo di tumore. Un altro marcatore utilizzato in fase di screening è la calcitonina, che è il marcatore del carcinoma midollare della tiroide (forma particolare di tumore che deriva dalle cellule parafollicolari). Questo marcatore non solo è utile per la fase diagnostica, ma viene anche impiegato per lo screening sui familiari, poiché alcune forme di questo tumore sono familiari. Anche lo screening del PSA è utile per individuare precocemente il carcinoma prostatico. Alcuni marcatori aumentano solo nel caso di tumore avanzato, per questo motivo in fase iniziale si utilizzano screening di diverso tipo, come nel caso del carcinoma della mammella in cui si opta per la mammografia.

UTILIZZO DEI MARCATORI TUMORALI

1. L'utilizzo ideale dovrebbe avvenire nella fase di screening, quindi prima della comparsa di segni e di sintomi (es. calcitonina, PSA).
2. Diventano molto utili nel momento della diagnosi, in cui si ha la comparsa di segni e sintomi. In questo caso supporta le tecniche diagnostiche e strumentali.
3. Sono utilissimi nel monitoraggio della terapia, in cui si ha la ricomparsa di segni e sintomi; quindi, permettono di monitorare il paziente neoplastico permettendo di valutare la risposta alla terapia.
4. Sono molto utilizzati nel monitoraggio della recidiva, in cui si ha la scomparsa di segni e sintomi, ma si ha il forte rischio di una recidiva che senza marcatore non potrebbe essere scoperta precocemente.

Screening: nessuno dei marcatori tumorali oggi in uso presenta caratteristiche idonee a questa funzione. In alcuni casi i marcatori possono essere usati per screening di popolazioni selezionate con maggior rischio di tumore:

- AFP nell'epatopatia cronica evolutiva.
- PSA nei maschi adulti dopo i 60 anni
- Screening di parenti più prossimi (es. calcitonina nel carcinoma midollare della tiroide).

Diagnosi: generalmente i marcatori tumorali non possono essere di aiuto diagnostico per la limitata sensibilità e specificità. Fanno eccezione alcuni marcatori dotati di alta specificità tissutale che possono essere usati in alcune particolari patologie. Sono di valido aiuto per una (esempio tra ipertrofia prostatica o neoplasia) in pazienti in cui si sospetta la presenza di neoplasia, anche con una sintomatologia non ben definita.

Tumore primitivo già diagnosticato: in questo caso il dosaggio dei marcatori deve essere fatto per:

- Avere un valore basale prima della terapia (necessario per poter effettuare una valutazione dinamica pre e post terapia).
- Avere indicazioni indirette sulla estensione della malattia (i valori ematici dei marcatori sono proporzionali alla massa del tumore).
- Avere indicazioni prognostiche.

Nella caratterizzazione biologica della neoplasia: lo studio dei marcatori tumorali è importante per la definizione di isotipo, in collaborazione con l'anatomo patologo si può ricevere il marcatore su citosol o tessuto (in questo caso si tratta di *marcatori tissutali*).

Il valore del marcatore contribuisce alla stadiazione e alla prognosi e quindi risulta indispensabile per determinare l'opportuna strategia terapeutica. Sul tumore asportato è possibile utilizzare marcatori tumorali che forniscono informazioni sulla prognosi del paziente e a scopo predittivo, ovvero per individuarli sulla base del trattamento terapeutico da effettuare. Ad esempio, la prima cosa che si valuta nel carcinoma della mammella è se il recettore istogenico è positivo o negativo; nel primo, infatti, si parte direttamente con la terapia ormonale (In questo caso il marcatore tumorale è un marcatore tissutale).

Grazie ai marcatori tissutali di cui si è a disposizione attualmente, è possibile stabilire un'ottima caratterizzazione biologica della neoplasia, utilissima nella fase prognostica e terapeutica.

Nel monitoraggio: questo è il caso in cui è più usato il marcatore tumorale ed è il ruolo più importante di tali indagini cliniche.

L'utilizzazione dei markers tumorali è richiesta nel pre/post-operatorio, durante la radio/chemio-terapia e nei casi in cui si sospetta la possibile formazione di metastasi.

Principali marcatori tumorali utilizzati nella pratica clinica (Allegate patologie neoplastiche correlate & altre cause di incremento:

- **CEA:** Carcinoma del colon retto – epatopatia cronica, cirrosi epatica, patologia benigna del polmone, insufficienza renale cronica...
- **CA 19.9:** Carcinoma pancreatico e delle vie biliari – patologie benigne del pancreas, delle vie biliari, epatiche, polmonari, malattie reumatiche e autoimmuni...

- **CA 72.4:** Carcinoma gastrico – patologie benigne gastrointestinali, cardiache, ginecologiche, polmonari, insufficienze renali, malattie reumatiche...
- **CA 15.3:** Carcinoma della mammella – patologia mammaria benigna, epatopatia, infezioni delle vie urinarie, patologie autoimmuni, gravidanza...
- **Alfa-fetoproteina:** Epatocarcinoma, tumore alle cellule germinali – epatite, cirrosi, ostruzione delle vie biliari, tossicità epatica da chemioterapia...
- **CA125:** Carcinoma ovarico, della tuba o dell'endometrio – endometriosi, infiammazione pelvica, epatopatia, ascite benigna, sierositi, leiomioma uterino, malattie infiammatorie intestinali, insufficienza cardiaca congenita, insufficienza renale...
- **PSA:** Adenocarcinoma prostatico – Iperplasia prostatica benigna, prostatite, ritenzione urinaria acuta, eiaculazione recente, uso di bicicletta o attività sportiva intensa...

Di seguito è riportato l'utilità dei marcatori sierici in diversi tumori:

- Nel **carcinoma del testicolo** si utilizzano principalmente: **alfa-fetoproteina**, la **gonadotropina corionica** e **LDH**. Non sono utilizzabili nello screening, ma risultano utili come supporto per quanto riguarda la diagnosi, staging e quindi nel monitoraggio.
- Allo stesso modo per la prostata; anche se il **PSA** è utilizzato per lo screening del **carcinoma prostatico**. Nei soggetti adulti viene ugualmente prescritto affinché venga dosato, ma anche in questo si presentano grossi limiti; infatti, il PSA incrementa anche in presenza di una *prostatite* o di *manovre diagnostiche*. Ad ogni modo PSA è utilizzato per lo screening, per la diagnosi risultando molto utile nella fase del monitoraggio.
In particolare, quando al paziente è stata asportata la prostata, essendo tessuto specifico, la registrazione di un incremento del PSA indica una recidiva e, dunque, una ripresa della malattia.
- Per quanto riguarda l'**ovaio** viene utilizzato il **CA-125**, non per lo screening ma piuttosto può essere utilizzato in fase diagnostica e nel monitoraggio.
- Per la **mammella** viene utilizzato il **CA 15.3**, la mucina più utilizzata come marcatore classico del tumore della mammella. Non risulta utile nello screening, neppure rappresenta una forma di supporto alla diagnosi; in quanto, in genere, questa mucina tende ad aumentare e ha una sensibilità e una specificità più elevata durante la fase più avanzata della neoplasia. Perciò, quando il tumore si trova già in uno stadio avanzato, il **CA 15.3** può essere utile nelle fasi finali di monitoraggio.

Ora, ci soffermiamo su alcuni esempi di marcatori genetici e molecolari trattando in particolare il **carcinoma polmonare non a piccole cellule**, uno dei tumori a maggiore incidenza insieme alla mammella e alla prostata; ma, soprattutto, rappresenta uno dei tumori legati ad un'alta mortalità. Negli ultimi anni la sopravvivenza per il carcinoma del polmone è notevolmente aumentata, grazie alla diagnosi e all'utilizzo di terapie alternative che intervengono su specifici target. Il carcinoma polmonare non a piccole cellule comprende per il 50% **adenocarcinoma** e per il 30% **carcinoma squamoso**.

Un tempo per l'adenocarcinoma polmonare si effettuava solamente l'asportazione chirurgica se possibile, l'unica alternativa per trattare il processo metastatico era rappresentata dalla chemioterapia. Oggi non è più così, è possibile infatti la **configurazione molecolare dell'adenocarcinoma** o anche del **carcinoma squamoso**. Viene quindi richiesto di ricercare specifici target per cui è disponibile una terapia che permetta una sopravvivenza più lunga rispetto alla classica chemioterapia. Un altro importante aspetto è che questi farmaci sono accompagnati da effetti collaterali ma, sempre meno impattanti rispetto a fenomeni tossici in presenza di chemioterapia. Dunque, la qualità di vita del paziente è nettamente migliorata. Naturalmente, le mutazioni non sono presenti in tutti i carcinomi polmonari, per cui vanno ricercati; passo ormai di routine sul tumore del polmone, mentre prima si aspettava l'eventuale presenza di metastasi. Attualmente, sul tumore primario, una volta asportato, si va alla ricerca di questi marcatori da poter poi utilizzare come trattamento nel caso in cui vi siano recidive o processi metastatici; fra questi ricordiamo:

- Per l'**adenocarcinoma** mutazioni di: KRAS, del recettore delle EGFR, del fattore di crescita, del ALK, del ROS-1, RET, del BRAF, del HER-2.
- Per il **carcinoma squamoso** abbiamo mutazioni di: FGFR1, PI3KCA, PTEN, PDGFR e DDR2.

Esiste, quindi, la possibilità di ricercare eventuali mutazioni per poi intervenire con una terapia adeguata. Un primo cambiamento rivoluzionario è stata la caratterizzazione biologica della massa tumorale con i suoi limiti; di fatto, si inquadra la situazione di quel momento, ma sappiamo che il tumore è estremamente

eterogeneo; quindi, anche durante la sua evoluzione o un processo metastatico può variare. Ulteriore importante passo che è stato fatto nell'ambito dell'oncologia è la cosiddetta **immunoterapia**, usata per numerosi tipi di tumori, quali: *carcinoma renale*, *carcinoma polmonare*, *adenocarcinoma* e *carcinoma della mammella*. Pertanto, l'immunoterapia consiste nell'utilizzo di alcune sostanze che intervengono sulla regolazione che il sistema immunitario esercita sul processo neoplastico. Uno dei biomarcatori maggiormente utilizzato in ambito immunitario, è il cosiddetto **PDL-1** (*Programmed Death-Ligand 1*), una proteina transmembrana che si lega al recettore **PD-1** per modulare la risposta immunità.

PD-1 è un recettore di membrana presente su alcune cellule del sistema immunitario, quali: cellule T, Natural Killer e alcuni linfociti; regola la risposta immunitaria nelle fasi tardive dell'infiammazione, inibendo l'attività dei linfociti T nei tessuti periferici. L'espressione di **PDL-1** sulle cellule tumorali, determina il legame di **PDL-1** al recettore **PD-1** presente a livello di queste cellule immunitarie, sopprimendo così la sorveglianza immunitaria e quindi favorendo la crescita tumorale. Una strategia di ultima generazione è denominata **CAR-T**, prevede che i linfociti T vengono ingegnerizzati per essere utilizzati nell'immunoterapia; nell'oncoematologia danno risultati ottimi.

L'immunoterapia a base di **Anti-PD-L1** o **Anti-PD-1** è utilizzata per diversi tipi di tumori, che non si trovano in fase iniziale. Si tratta di trattamenti terapeutici, associati o in alternativa alla chemioterapia, per tumori in stadio avanzato. Questi trattamenti hanno effetti collaterali, ma nettamente inferiori a quelli della chemio. È, quindi, importante andare a caratterizzare l'espressione del **PD-L1**, in quanto non è espresso in tutte le cellule tumorali; si deve perciò valutare se è presente o no e, eventualmente quantificarne l'espressione mediante l'immunoistochimica della molecola. È importante anche una valutazione della percentuale di espressione del **PD-1**; spesso comporta un esame complesso, data la eterogeneità di espressione nelle cellule tumorali. È necessario, infine, valutarne sia il numero che il grado di intensità, per capire se si possa avviare una immunoterapia o meno.

L'IMMUNOTERAPIA NELL'AMBITO DEL PD-L1: In condizioni normali, **PD-L1** si lega ai recettori **PD-1** bloccando la risposta immunitaria. Se si va a bloccare **PD-L1** o **PD-1** (in quest'ultimo caso si blocca l'espressione del **PD-1**), allora il legame tra molecola e recettore non avviene; quindi, le cellule tumorali bloccano la crescita neoplastica. Questo è un esempio di immunoterapia, ma ce ne sono tanti altri.

THERAPEUTIC TARGETING OF THE HALLMARKS OF CANCER: I target terapeutici possono andare a targettare gli **Hallmarks of Cancer** che favoriscono e sostengono il processo neoplastico. Per ognuno di essi esistono terapie mirate che bloccano la crescita del tumore.

Per esempio, per quanto riguarda la *proliferazione*, esistono terapie come quella **anti-ormonale**, che vanno a targettare i recettori soggetto o quelli che inibiscono i fattori di crescita a sostegno della crescita tumorale.

Esistono anche altri target terapeutici, quali:

- Inibitori della ciclica-chinasi dipendenti, coinvolti nel processo di soppressione della crescita.
- Target che intervengono nel sistema immunitario, come **PD-L1**, ma esistono anche gli **Anti-CTLA4**, che hanno lo stesso significato del **PD-L1**. Si tratta di altri farmaci che intervengono nella modulazione della risposta immunitaria.
- Inibitori delle telomerasi.
- Farmaci che vanno selettivamente a bloccare l'infiammazione.
- Farmaci che intervengono in maniera specifica sulla invasione e sulla metastasi.
- Farmaci che intervengono sui processi angiogenici.
- Farmaci che intervengono nell'instabilità genomica.
- Sulla resistenza alla morte cellulare.
- Quelli che intervengono sul metabolismo cellulare.

Essi sono utilizzati nella target therapy, cioè la **terapia personalizzata**, che cambia in base al tipo di tumore e all'espressione dei marcatori che quel tumore esprime. Quindi, dà la possibilità di unire alle terapie tradizionali come interventi chirurgici, radio e chemio, e di intervenire con una terapia sempre più personalizzata.

DOSAGGIO DEI MARKERS TUMORALI CLASSICI: Per il dosaggio dei **marcatori circolanti** e classici, che si utilizzano soprattutto nella fase di monitoraggio e che hanno poco utilizzo nella fase

diagnostica, si usano metodi semplici chiamati “**metodi immunometrici**”, cioè basati sull’affinità dell’antigene con l’anticorpo. Sono metodi affidabili quasi al 100%, quindi permettono l’individuazione del marker in modo abbastanza preciso, anche grazie all’utilizzo degli anticorpi monoclonali ampiamente impiegati in questo tipo di metodiche. Questi metodi garantiscono dei risultati molto attendibili.

- Sono dei test di facile utilizzo.
- Sono alla portata di tutti i laboratori.
- Hanno il vantaggio di essere eseguiti facilmente su campioni di sangue e quindi si possono prendere più volte nel corso degli anni.

I metodi immunometrici sono **metodi comparativi**, alcuni vengono rapportati ad uno **standard internazionale** (CEA, AFP, hCG, tireoglobulina, calcitonina e PSA).

N.B.: È importante monitorare un marker sempre nello stesso laboratorio, il quale dovrà indicare sul referto il metodo utilizzato.

LA CONCENTRAZIONE DEI MARKER TUMORALI NEL SIERO: La concentrazione del marcatore tumorale nel siero è in funzione di una serie di condizioni, quali:

- Numero delle cellule produttrici un determinato marcatore tumorale.
- Le caratteristiche biochimiche del marcatore.
- La quota di liberazione del marcatore dalla cellula tumorale.
- La vascolarizzazione del tumore.
- Grado di necrosi del tumore.
- Quota di metabolizzazione del marcatore.
- Complessazione con anticorpi per essere rilevato mediante i metodi immunometrici.

I metodi immunometrici sono ampiamente utilizzati per i cosiddetti **marcatori sferici o circolanti**.

Vengono utilizzati nella pratica clinica per monitorare la storia del paziente oncologico; quindi, sono utili nella fase di monitoraggio, ma non nella fase diagnostica.

DIAGNOSTICA MOLECOLARE: Qui sono riportati altri metodi che rientrano nella diagnostica molecolare, utilizzata per individuare i marcatori tissutali o le mutazioni di particolari geni oncogeni o oncosoppressori, che rientrano nella “medicina personalizzata”. Proprio in funzione di queste tecniche, oggi si hanno a disposizione un largo numero di marcatori. Alcune tecniche sono:

- La **PCR** (la più utilizzata è la Real Time PCR) permette di quantizzare il valore che si ricerca.
- La **Macroarray**, permette di avere i profili di espressione genica, quindi di conoscere l’espressione completa della massa tumorale.
- La **Digital PCR**, che è una forma particolare di PCR.
- La **FISH** (fluorescenza in situ) è molto utilizzata per rilevare diversi marcatori tumorali.
- **Next Generation Sequencing** (NGS), ancora poco utilizzata. Si tratta di una tecnica di ultima generazione che consente di avere non solo l’espressione dei geni mirati che si vanno a ricercare, ma contemporaneamente di più geni che permettono di intervenire con diversi trattamenti terapeutici.

Queste tecniche vengono utilizzate, non solo in fase diagnostica, ma anche per la prognosi delle neoplasie e permettono l’individuazione della terapia farmacologica mirata. Quindi ricercare tutti questi marcatori, cosiddetti “predittivi”, sono usati per valutare la “**malattia minima residua**”, soprattutto nell’ambito dell’oncoematologia, ma anche nella diagnosi della predisposizione ereditaria alla patologia.

GENOMICA E PROTEOMICA: Nel corso del tempo, molti progressi si sono verificati nell’ambito della genomica, ma attualmente grandi passi avanti si sono verificati nell’ambito della proteomica. La proteomica viene usata come **biomarker della malattia**, cioè per identificare quelli che possono essere dei marcatori da poter utilizzare in ambito neoplastico. Dunque, la **proteomica** serve:

- Per valutare l’espressione proteica dei campioni sani e patologici.
- Identificare proteine sconosciute.
- Identificare mutazioni e/o modificazioni post-traduzionali, che non si identificano utilizzando le classiche tecniche del campo della genomica.

Le tecniche maggiormente utilizzate nella proteomica sono:

- *Immunoassay classico.*

- La *spettrometria di massa*, utilizzata per identificare proteine.
- *Macroarray and Reverse-phase protein array* (RPPA), quest'ultima permette di identificare più proteine di quel tessuto patologico che si analizza.

L'INTERPRETAZIONE DEL DATO DI LABORATORIO DEI MARKERS TUMORALI:

L'interpretazione del dato di laboratorio nell'utilizzo clinico dei marcatori tumorali di un tessuto si basa su:

- Innanzitutto, la valutazione della presenza o meno dei marcatori.
- Se sono presenti, bisogna valutare quale sia la terapia personalizzata adeguata al trattamento della malattia.

Per quanto riguarda i marcatori che si dosano su siero (quei marcatori che si utilizzano soprattutto nel monitoraggio del paziente oncologico, per valutare la risposta al trattamento terapeutico, l'evoluzione del tumore e per valutare l'eventuale presenza di recidive), il dato di laboratorio ottenuto dal marcatore tumorale può essere valutato basandosi su un singolo referto o su più referti successivi.

- Se si ha un singolo referto, quindi un solo dato del marcatore tumorale, si adotta il “**criterio dicotomico**”; ci si basa sul valore soglia di quel marcatore tumorale. Dunque, si stabilisce se il soggetto ha un valore più basso o più elevato rispetto alla soglia e, quindi, si considera così il marcatore negativo o positivo.
Questo è utile nel bilancio iniziale pre-trattamento, per avere un punto di partenza con la terapia, può essere inoltre un dato di supporto nella fase diagnostica (se si ha un forte sospetto di un determinato tipo di tumore, ad esempio).
Se il risultato risulta negativo, tuttavia, non vuol dire che il paziente non abbia il tumore; viceversa, un risultato positivo rafforza l'ipotesi diagnostica, andando ad avvalorare i risultati della diagnostica strumentale ampiamente utilizzata durante l'iter diagnostico dei pazienti neoplastici.
- Quando si va ad interpretare il dato del marcatore tumorale per il monitoraggio del paziente oncologico, si effettua una **valutazione dinamica** basata su più referti successivi.
Ciò è utile nel post-operatorio, nel monitoraggio della terapia, nel follow-up.
In questo caso, non si va a valutare il valore del marcatore solo rispetto al valore soglia, ma anche rispetto al valore del marcatore durante il periodo pre-trattamento (ad esempio, per monitorare com'è la risposta al trattamento stesso).

LA BIOPSIA LIQUIDA: Il termine biopsia liquida fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici, come surrogato al tessuto neoplastico, per ottenere informazioni utili ai fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta alla terapia. La biopsia liquida non è il dosaggio dei marcatori circolanti. Per biopsia liquida si intende il dosaggio su siero, sangue, urina, liquido ascitico (ecc.) di marcatori specifici per i tessuti. È una metodica già presente, ma che porta ancora scarsi risultati.

PROSPETTIVE FUTURE: BIOPSIA LIQUIDA: Quando si ha un **tumore primario**, che cresce e tende ad invadere localmente i tessuti, le sue cellule si riversano a livello dei vasi sanguigni e linfatici. Le cellule tumorali, o piccole parti contenute all'interno del tumore stesso, sono presenti anche a livello del torrente circolatorio. Dunque, si ha la possibilità di dosare elementi contenuti all'interno della cellula che si trovano nei fluidi biologici per individuare il tumore. In questo modo si evita l'effettuazione della biopsia tissutale potendo così utilizzare, ad esempio, un semplice prelievo di sangue. Questo potrebbe essere utile sia nella fase diagnostica che nella fase avanzata, in quest'ultimo caso per valutare la prognosi e la possibilità di individuare nuovi target terapeutici. Il vantaggio della biopsia liquida è che il paziente non verrebbe sottoposto ad un trauma; anche in presenza di una metastasi non si effettuerebbe la biopsia su di essa per valutare i cambiamenti o i marcatori. Ad esempio, nel caso delle *metastasi cerebrali* non è possibile effettuare una biopsia a livello cerebrale, si deve necessariamente intervenire chirurgicamente. La biopsia liquida può essere effettuata su numerosi campioni, in generale su tutti i fluidi corporei: Il più utilizzato è il **sangue**, nello specifico il **siero**; **Urine**; **Feci**; **Saliva**; **Liquido ascitico**; **Liquido pleurico**.

VESICOLE EXTRACELLULARI (EVs): Le vescicole extracellulari (EVs) sono piccole vescicole rivestite da un doppio strato fosfolipidico, prodotte da molte tipologie cellulari con lo scopo di veicolare il proprio contenuto (**cargo**) alle cellule bersaglio. *Quali marcatori si dosano su questi tessuti?*

- **CTCs:** cellule tumorali circolanti.

Si presume che se il tessuto tumorale finale è andato avanti nella sua evoluzione, queste cellule passino in circolo. Questo prima che avvenga la metastasi. Si hanno ancora scarsi risultati poiché le tecniche devono essere migliorate. Attualmente si dosano anche in caso di metastasi, per cercare altri profili molecolari.

- **ctDNA:** DNA presente in queste cellule circolanti.
- **RNA:** RNA presente nelle cellule circolanti.
- **miRNA:** microRNA presente nelle cellule circolanti.
- **Proteine:** proteine presenti nelle cellule circolanti.
- **EVs:** Vescicole extracellulari.

Si è visto che tutti i tipi di cellule possono liberare, con meccanismi ben precisi, queste EVs rivestite dal doppio strato fosfolipidico, che al loro interno contengono DNA, mRNA, miRNA, ecc. Queste vescicole extracellulari possono essere dosate, poiché il cargo presente al loro interno rispecchia la loro cellula d'origine. Anche le cellule tumorali hanno la capacità di produrre le EVs, che utilizzano per veicolare il loro contenuto in un sito bersaglio a distanza. Perciò, se si riesce ad isolare le EVs si è in grado di valutare la cellula d'origine.

PUNTI DI FORZA E LIMITI DEI BIOMARCATORI CIRCOLANTI NEL CANCRO

1. **Invasività:** la biopsia liquida, nella quale si dosano gli elementi descritti in precedenza (*ctDNA*, *CTC*, ecc.), è minimamente invasiva. la biopsia tradizionale, invece, è invasiva.
2. **Tempistica:** il tempo impiegato nella biopsia liquida è molto più breve rispetto a quello della biopsia tradizionale.
3. **Sensibilità:** la sensibilità della biopsia liquida è molto più elevata rispetto a quella tradizionale.
4. **Costi:** nella biopsia liquida sono più bassi per quanto riguarda l'isolamento del campione, come ad esempio nel caso del prelievo di sangue o delle urine.
5. **Validità clinica:** la biopsia liquida non è ancora clinicamente validata a differenza della biopsia tissutale; inoltre, quest'ultima permette di fornire una valutazione istologica del campione.
6. **Monitoraggio:** la biopsia liquida permette di valutare continuamente il tumore, mentre in quella tissutale non è possibile. In quest'ultimo caso, infatti, se il tessuto tumorale evolve (evento che accade spesso) non si ha la possibilità di stabilirlo.
7. **Risposta terapeutica:** con la biopsia liquida questo monitoraggio è possibile in tempo reale, mentre con la biopsia tissutale non si può sapere come varia la risposta ad un determinato marcatore.
8. **Ripetibilità:** la biopsia liquida è facilmente ripetibile, a differenza di quella tissutale.
9. **Eterogeneità del tumore:** la biopsia liquida rivela l'eterogeneità del tumore, che è responsabile della maggior parte delle mancate risposte terapeutiche e della resistenza alle terapie attuali.

PROSPETTIVE FUTURE DELLA BIOPSIA LIQUIDA: - Tramite il dosaggio di tutte le componenti possibili presenti all'interno di una biopsia liquida, potrebbe essere utile in una fase di **screening e diagnosi precoce** - Potrebbe risultare utile nel rischio di **ripresa della prognosi** - Nell'identificare i vari **target terapeutici** - Nel valutare l'**eterogeneità del tumore** - Nel monitorare in tempo reale la malattia e la **risposta ad un trattamento terapeutico** - Nello **stratificare i pazienti** e di conseguenza scegliere il trattamento terapeutico più idoneo. La biopsia liquida viene già effettuata, ma i risultati sono ancora scarsi e imprecisi.

APPLICAZIONI CLINICHE IN VARI TIPI DI TUMORE RIPORTATE IN LETTERATURA: Ad esempio, l'utilizzo delle **EVs circolanti** è stato riportato nel **carcinoma prostatico**; mentre l'identificazione di specifici **miRNA** è stata riportata nei **tumori non a piccole cellule** a livello **polmonare**. Nei **melanomi**, la presenza nella biopsia liquida del **miR-211-Sp** può predire la resistenza verso un determinato farmaco utilizzato. Sono stati anche riportati studi rispetto alla presenza delle **CTCs** e delle mutazioni di oncogeni presenti in queste cellule, come l'**EGFR**, il **KRAS** (ecc.), e del DNA di queste cellule. L'effettuazione della biopsia liquida attualmente può essere condotta per ottenere un panorama più ampio degli elementi che si riscontrano tramite la sola biopsia tissutale.

VANTAGGI DELLA BIOPSIA LIQUIDA NEI TUMORI: Variano a seconda del biomarker utilizzato, quindi nel caso di CTCs, il DNA circolante, l'RNA circolante, le proteine circolanti o le EVs circolanti.

- Le **CTCs** sono cellule cancerose che presentano particolari marcatori dosati. Il loro vantaggio è che derivano dal tessuto neoplastico, ma un grosso limite è che le tecniche attualmente utilizzate riescono ad isolare una quantità minima di cellule.
- Il **DNA circolante** è utilizzato soprattutto per valutare mutazioni specifiche. Il vantaggio è che è molto semplice da valutare con tecniche avanzate, ma il limite è che non possono essere utilizzate su tumori non mutati.
- L'**RNA circolante** (che comprende anche il miRNA, l'mRNA etc...), è maggiormente presente nel torrente circolatorio, quindi, è più facile da isolare. Il limite è che è molto instabile e decade facilmente a causa della presenza di numerose RNAsi.
- Le **proteine circolanti** sono molto presenti nella circolazione, ma hanno una bassa specificità e si possono trovare anche in pazienti senza cancro.
- Le vescicole extracellulari circolanti (**EVs**) sono state soggette a numerosi studi poiché all'interno contengono diversi elementi (carga) protetti dal doppio strato lipidico cellulare. Un limite del loro utilizzo è dovuto al fatto che le tecniche per l'isolamento, la purificazione e la quantificazione delle vescicole non è ancora ottimale.

CARCINOMA MAMMARIO: Il **carcinoma mammario** è uno dei tumori più frequenti, soprattutto nel sesso femminile. Riguarda circa il 24,5% e rappresenta la forma più frequente di tumore in assoluto con una mortalità ancora abbastanza elevata, intorno al 15,5%. È un tumore che colpisce 1 persona su 4 ed 1 persona su 6 per quanto riguarda la mortalità. La sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi è intorno al 90%.

Per quanto riguarda la **classificazione istopatologica** del tumore mammario, è un tumore maligno che origina dalle **cellule epiteliali della ghiandola mammaria**. Può derivare:

- Dai **lobuli**, in tal caso si tratta della **forma lobulare**.
- Dai **dotti**, si tratta della **forma duttale**.

Sia la forma lobulare che la forma duttale possono essere **in situ**; sono caratterizzate da una proliferazione di cellule epiteliali maligne che non superano la membrana basale e che quindi non sono capaci di sviluppare metastasi. È poi possibile avere il **cancro invasivo**, cioè in grado di infiltrare i tessuti circostanti, di andare in circolo e quindi dare origine a metastasi. La **forma duttale** è quella più frequente intorno all'80%, mentre la **forma lobulare** è di circa il 20%; si possono presentare in situ o in forma invasiva. Le altre forme di carcinoma mammario riguardano: Mucinoso, con un'incidenza che varia dal 3% al 5% - Mucinoso o colloide intorno al 2% - Papillare sotto l'1% - Tubulare sotto il 2%.

Esistono poi anche altri istotipi che hanno delle manifestazioni cliniche particolari; fra questi ricordiamo, per esempio la **forma di Paget** caratterizzata sempre da carcinoma di tipo duttale che tende ad essere presente soprattutto a livello del capezzolo. Una forma particolare e molto aggressiva di carcinoma mammario è il cosiddetto **carcinoma mammario infiammatorio** che comprende, appunto, questa manifestazione clinica peculiare; è, infatti, caratterizzato da una grande invasività. È possibile avere anche altre forme, come **mixed breast cancer**, il **tumore filloide**, l'**angiosarcoma** o il **fibroadenoma** (che rientra nelle forme benigne) e altre ancora.

Oltre ad una classificazione istopatologica si effettua la **classificazione molecolare** del carcinoma mammario; che sulla base di alcuni marcatori specifici presenti a livello tissutale, una volta effettuata la diagnosi di carcinoma mammario, permette di classificarli da un punto di vista molecolare. Ogni istotipo è caratterizzato dal suo grado di frequenza e di aggressività. Questi marcatori molecolari presenti a livello tissutale, che sono soprattutto recettori molecolari, cioè recettori ormonali di tipo estrogenico e progestinico, vengono valutati di routine una volta diagnosticato il carcinoma mammario. Inoltre, si valuta la presenza o meno di **HER2**, un recettore transmembrana per fattori di crescita; si valuta anche il **fattore di proliferazione Ki67**. Sulla base di questi parametri il carcinoma mammario viene classificato in:

- **Luminal A** → rappresenta la forma più frequente di carcinoma mammario (circa il 40% 50%), è la forma di tumore mammario con: Recettore estrogenico positivo - Recettore progestinico positivo - HER2 negativo - Indice di proliferazione Ki67 molto basso. Risponde bene alla terapia endocrina, cioè la terapia anti-ormonale; rappresenta una forma più "benigna" con una migliore prognosi in quanto, si registra una sopravvivenza a 5 anni intorno al 94%.

- **Luminal B** → è caratterizzato da: Recettore estrogenico positivo - Recettore progestinico positivo - Comprende una prima forma HER2 negativo e fattore di proliferazione Ki67 elevato - Una seconda forma con HER2 positivo e fattore di proliferazione Ki67 che può essere elevato oppure no. Luminal B costituisce circa il 20%-30% delle forme di tumore mammario, è moderatamente differenziato e quindi è un grado 2. Risponde bene sia alla terapia endocrina, sia alla chemioterapia ed anti-HER2+ (che rappresenta la target therapy). Si ha una sopravvivenza a 5 anni intorno al 90%.
- **Tumore HER2 positivo** → è un tumore con: Recettore estrogenico negativo - Recettore progestinico variabile - HER2 positivo - Indice di proliferazione Ki67 elevato. Questo tipo di tumore ha frequenza intorno al 15%-20%. È poco differenziato; infatti, in genere, corrispondono al grado 3. Si procede con la target therapy diretta contro il recettore HER2 e associata alla chemioterapia; si ha una sopravvivenza a 5 anni intorno al 84%.
- **Triplo negative** → forme più aggressive del carcinoma mammario: Sono negativi tutti i recettori (ER+, PR+ e HER2) - Indice di proliferazione Ki67 molto elevato. A questo punto, a seconda dell'espressione di alcune *citocheratine* è possibile fare una distinzione tra: **Basal-like & Non basal-like**.

Non si può procedere con l'anti-ormone terapia e neppure con la target therapy, hanno un grado di differenziazione molto basso e generalmente corrispondono al grado 3. È possibile intervenire solo con la classica chemioterapia e con altri tipi di terapia che oggi sono entrati nella pratica clinica; si ha una sopravvivenza a 5 anni intorno al 77%. L'eventuale presenza di metastasi per questi sottotipi molecolari varia in base al tipo molecolare, **ad esempio** negli HER2 positivi e triplo negativi basal-like si hanno metastasi soprattutto al cervello. Naturalmente si ha anche interessamento linfonodale, che riguarda soprattutto il cavo ascellare.

I fattori di rischio che concorrono all'emergenza del carcinoma mammario sono:

- **Età**: Si raggiunge il picco di rischio tra i 40 ed i 60 anni - **Fattori ambientali**: radiazioni effettuate nella regione che interessa anche le ghiandole mammarie per altre patologie ad esempio neoplastiche (quale può essere il linfoma) - **Razze ed Etnie** - **Fattori ormonali** - **Storia personale e familiare**: aumentato rischio per i familiari di primo grado di donne con storia di carcinoma mammario o per donne che hanno già avuto un carcinoma (ricorda che soltanto il 5% è tipo ereditario, con difetti genetici con mutazioni degli oncosoppressori) - **Difetti genetici**: mutazioni a carico degli oncosoppressori **BRCA1** e **BRCA2** rappresentando i 2/3 del carcinoma mammario ereditario. La mutazione di questi oncosoppressori è coinvolta anche nel carcinoma ovarico e nel carcinoma prostatico nell'uomo - **Storia riproduttiva** - **Fattori ormonali** - **Finestra estrogenica**: maggiore è il tempo in cui il nostro tessuto mammario è esposto all'azione degli ormoni estrogeni, maggiore è il rischio di andare incontro al carcinoma. Nei tumori ER+ (positivi ai recettori estrogeni) viene effettuata una terapia anti-ormonale, ossia viene bloccata l'azione degli estrogeni. Sebbene i tumori ER+ siano quelli a migliore prognosi, ossia che rispondono meglio al trattamento terapeutico, costituiscono la maggior parte dei carcinomi mammari. **RICORDA**: L'esposizione agli estrogeni nella donna va dalla comparsa del menarca fino alla menopausa; - **Sovrappeso e obesità**: la condizione di sovrappeso e di obesità aumenta il rischio di andare in contro al carcinoma mammario, in quanto si verificano una serie di condizioni che favoriscono un'aumentata incidenza.

L'ipertrofia e iperplasia del tessuto adiposo induce un'alterata produzione da parte degli adipociti di una serie di fattori di crescita, citochine e adipochine stesse, che risultano completamente alterate rispetto al soggetto normopeso e che concorrono a determinare sia effetti diretti sulle cellule epiteliali (quindi tumorali mammari) che indiretti sul microambiente tumorale, inoltre in genere in soggetti sovrappeso è presente una insulino-resistenza che induce una condizione di **iperinsulinemia**, per compensare questo stato, o un aumento dei fattori di crescita. Sempre a livello sistemico, nei soggetti obeso - sovrappeso si ha anche un'**alterata produzione** di alcune **adipochine**, secrete dalle cellule adipose: Tanto più sono elevati o alterati quanta più massa adiposa è presente.

Tra queste adipochine, che giocano un ruolo importante nel favorire lo sviluppo e la progressione del tumore mammario, ricordiamo la **leptina**; un ormone secreto principalmente dalle cellule del tessuto adiposo. La leptina è stata identificata come ormone ampio obesità, in quanto agisce a livello di alcuni centri dell'ipotalamo, dove regola il senso della sazietà e della fame; quindi, in realtà in un soggetto obeso dovrebbe funzionare come sostanza antiobesità; invece, si è visto che nei soggetti sovrappeso - obeso è presente una **leptino-resistenza centrale** (e non periferica). Per cui, la leptina non riesce ad esercitare la sua principale azione a livello centrale mentre esercita normalmente i suoi effetti a livello periferico. Questo incremento di

leptina, a livello sistemico, si è visto essere coinvolto nella cooperazione con il carcinoma mammario, favorendo lo sviluppo e la progressione del carcinoma mammario; in quanto, un effetto proliferativo aumenta l'angiogenesi, la motilità delle cellule neoplastiche e intervenendo anche sul microambiente tumorale. In quest'ultimo caso, può alterare ad esempio i **Cancer associated fibroblasts**, le cellule immunitarie o le cellule endoteliali presenti a livello del microambiente. Sono ormai diversi i dati provenienti dalla ricerca di base che dimostrano la correlazione diretta tra l'incremento di leptina e l'aumentato sviluppo e progressione del carcinoma mammario. Quindi, in un soggetto obeso, la leptina è elevata e si ha un aumento dello sviluppo di questa patologia. Nell'ambito delle adipochine, l'**Adiponectina** svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo del carcinoma mammario. Ha infatti un'azione opposta a quella della leptina, e dagli studi effettuati è emerso che nei pazienti obesi rappresenta un fattore di rischio quando i suoi livelli sono bassi. Oltre alle adipochine, una condizione sistemica che favorisce l'aumentata insorgenza del tumore mammario nei soggetti obesi, è la presenza di più **estrogeni**. Il tessuto adiposo è ricco dell'**enzima aromatasi**, che converte gli androgeni in estrogeni. Per cui, un aumento del tessuto adiposo porterà all'aumento di questo enzima, con maggiore conversione di androgeni in estrogeni nelle donne, determinando una condizione di **ipoestrogenismo aciclico** (normalmente la produzione di estrogeni è controllata dall'asse ipotalamo-ipofisi durante il ciclo mestruale della donna, in questo caso il termine "aciclico" fa riferimento all'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi) che costituisce un importante fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma mammario. L'ultimo fattore di rischio associato all'obesità è l'**aumentata secrezione di molecole legate ad effetti infiammatori**.

CARCINOMA MAMMARIO NELL'UOMO: Rappresenta lo 0,8-1,2% di tutti i tumori mammari - È più frequente nelle popolazioni africane. Fattori di rischio: *iperestrogenismo, danno epatico, radiazioni ionizzanti*. Sono molto rari, ma quando presenti si manifestano in forma aggressiva.

CARCINOMA MAMMARIO: DIAGNOSI

- **Anamnesi accurata:** si ricercano gli eventuali fattori di rischio (familiarità positiva, esposizione a radiazioni, valutazione menarca ecc.) - **Autoesame** (osservazione del seno, autopalpazione, in particolare la palpazione del cavo ascellare, in quanto i linfonodi che vengono interessati per primi sono quelli ascellari) - **Esame clinico** (nodulo, secrezione dal capezzolo, iperemia e tumefazione della mammella, retrazione ed ulcerazioni cutanee, cute a buccia d'arancia) - **Ecografia:** data la minima invasività è uno dei primi esami richiesti, soprattutto in giovani donne nelle quali il tessuto mammario è molto compatto e risulta più difficile individuare eventuali alterazioni tramite mammografia - **Mammografia - Biopsia mammaria ed esame citologico - Risonanza magnetica:** utilizzata per supportare la diagnosi di un'eventuale lesione maligna evidenziata durante la mammografia.

CARCINOMA MAMMARIO: TERAPIA

1. **Chirurgia:** Demolitiva (Mastectomia totale) - Conservativa (Quadrantectomia) - Linfadenectomia (Svuotamento del cavo ascellare).
L'approccio chirurgico dipende dalla stadiazione e dal tipo molecolare di tumore. Se nella maggior parte è il primo approccio terapeutico, molte altre volte si procede anche con la terapia neoadiuvante (prima chemio o radioterapia per ridurre le dimensioni del tumore e poi il trattamento chirurgico). Nel caso in cui il tumore sia molto piccolo, si parla di **tumorectomia**, ovvero l'asportazione del solo tumore. Con la **linfadenectomia** si valuta per primo il linfonodo sentinella e, se i linfonodi sono negativi, non si procede allo svuotamento del cavo ascellare, altrimenti sì.
2. **Radioterapia:** deve essere effettuata entro alcuni giorni dall'intervento chirurgico, in modo tale da poter distruggere eventuali cellule tumorali presenti in situ dopo l'intervento chirurgico.
3. **Chemioterapia** (Taxani e Antracicline).
4. **Ormonoterapia:** effettuata con Antiestrogeni che bloccano l'azione degli estrogeni sui propri recettori, oppure da inibitori dell'Aromatasi che inibiscono la conversione degli androgeni in estrogeni). L'ormonoterapia, a prescindere dagli altri trattamenti, viene sempre prescritta ed effettuata nei pazienti con tumore *Luminal A* e *Luminal B*, cioè con carcinoma mammario ER+.
5. **Target Therapy e Immunoterapia:** Cyclin-dependent kinases 4/6 inhibitors - Phosphoinositide-3 kinase inhibitors - Tyrosine kinase inhibitors - ADP-ribose polymerase inhibitors - Histone deacetylase inhibitors - Monoclonal antibodies - Antibody-drug conjugates - Immune checkpoint inhibitors - Gamma-delta T ($\gamma\delta$ T) cell stimulators - Bone modifying drugs.

Altri esempi di terapia sono quelli che vanno a bloccare l'enzima aromatasi, chiamati ***inibitori dell'aromatasi***; o ancora quelli che intervengono a livello del tessuto osseo e quelli che intervengono come immunoterapia, gli anti-PDL1 e anti-PD-1, che bloccano il legame di PD-1 e PDL-1, favorendo l'attacco delle cellule immunitarie nei confronti della cellula neoplastica. L'immunoterapia ultimamente viene utilizzata nel carcinoma della mammella con più frequenza, per esempio nel triplo negativo metastatico, venendo utilizzata anche come marcatore tumorale, in quanto si ottengono ottime risposte con ridotti effetti collaterali rispetto al classico trattamento chemioterapico. Si hanno anche farmaci che bloccano i recettori di membrana e che sono dunque anticorpi monoclonali specifici. Infine, si possono avere: I *recettori* che bloccano l'attività tirosin-chinasica - Gli *inibitori delle cicline* - I *pattern inhibitor*, utilizzati nelle forme di carcinoma della mammella *BRCA1* e *BRCA2* positivi - Gli *inibitori dell'istone deacetilasi* Ecc...

SCELTA DEL TRATTAMENTO: è **necessario** evitare un trattamento eccessivo nelle pazienti che ricevono solo un modesto beneficio, mentre soffrono di effetti tossici. Il trattamento più utilizzato è quello chirurgico. È necessario definire le caratteristiche specifiche che forniscono la possibilità per l'*ottimizzazione del trattamento individuale*.

MARCATORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI

- **Marker Prognostico:** un qualsiasi parametro misurabile che prevede l'outcome di un paziente (disease-free and overall survival), indipendentemente dal trattamento terapeutico. Prevede la *prognosi* del tumore.
- **Marker Predittivo:** prevede la probabilità di risposta di un paziente ad uno specifico trattamento terapeutico ed è associato ad una sensibilità o resistenza del tumore ad una data terapia. Fondamentale per scegliere il *trattamento* più efficace per un determinato tipo di tumore.

Quelli convenzionali si utilizzano già nella pratica clinica. Esistono poi marcatori in via di investigazione, che possono essere effettuati sia su tessuto che in circolo. Per quanto riguarda i marcatori convenzionali, si ha la classificazione **TNM**, che permette di ottenere una stadiazione del tumore. Questa classificazione è di tipo prognostica, *non predittiva*, poiché è strettamente legata alla prognosi del tumore.

CLASSIFICAZIONE TNM

- **T** = tumor size, dimensione del tumore solido primario e grado d'infiltrazione nei tessuti circostanti. Questo parametro misura la grandezza del tumore, può andare da 0 = tumore non presente, a 1 per i tumori più piccoli, fino a 4 per quelli più grandi (T0, T1, T2, T3 e T4).
- **N** = assenza o presenza di coinvolgimento dei linfonodi regionali.
- **M** = assenza o presenza di metastasi lontane (non regionali) dalla sede del tumore primario.

M può essere solo 0 oppure 1, perché basta anche solo una metastasi a distanza e diventa positivo(1)

I siti metastatici maggiormente colpiti sono: *Fegato, Ossa, Polmone, Cervello*

A seconda dei parametri **T**, **N** ed **M**, può essere definita la stadiazione del tumore, che va dallo stadio 1 allo stadio 4. **In base alla possibilità o meno che ha il tumore di estendersi ai linfonodi e dalla presenza o meno delle metastasi a distanza si** possono distinguere i diversi stadi del tumore. Gli stadi sono:

- **Stadio 0**, con presenza in situ di un tumore dalle dimensioni ridotte.
- **Stadio 1**, T1 con assenza di linfonodi negativi e metastasi a distanza negative.
- **Stadio 2A**, inizia ad essere evidente l'interessamento linfonodale con T2. Si può passare ad uno *Stadio 2B*.
- **Stadio 3A**, dove aumentano le dimensioni del tumor size e si ha un interessamento maggiore dei linfonodi.
- **Stadio 3B** e **3C**, corrisponde a qualunque dimensione del tumore con N3 linfonodale.
- **Stadio 4** del carcinoma metastatico, cioè un tumore con metastasi a distanza.

N.B.: quando si è di fronte a metastasi, a prescindere dall'interessamento linfonodale e dalla dimensione del tumore, ci si trova già allo stadio 4.

La **stadiazione** è un marcatore prognostico fondamentale, perché quanto più il tumore viene diagnosticato ad uno stadio precoce, maggiore è la probabilità di sopravvivenza del paziente. Ad uno stadio 1 e 2, la probabilità di sopravvivenza è sicuramente maggiore rispetto a uno stadio più avanzato del tumore.

MARCATORE PROGNOSTICO: IL GRADING: Un altro marcatore prognostico importante è rappresentato dal **Grading**, cioè il “*grado del tumore*”. Mentre la stadiazione è il risultato di tutti gli esami diagnostici effettuati dall’oncologo, il Grading viene valutato dall’anatomopatologo.

Infatti, il Grading è un risultato di tipo istologico e definisce la capacità aggressiva e la malignità delle cellule tumorali. Il Grading, quindi, viene valutato al microscopio e si identifica in 3 gradi, (si passa dal grado 1 al grado 2 e 3), in ordine crescente di malignità:

- **G1 (grado basso):** si tratta del grado a prognosi migliore. In questo caso le cellule del tumore sono ben differenziate, cioè molto simili alle cellule del tessuto mammario.
- **G2 (grado intermedio):** grado in cui le cellule perdono la caratteristica di essere ben differenziate e diventano moderatamente differenziate e presentano dunque un decorso clinico intermedio.
- **G3 (grado elevato):** il tumore è scarsamente differenziato, per cui le cellule tumorali hanno un aspetto completamente anomalo e differente dalle cellule epiteliali di origine; quindi, perdono le caratteristiche delle cellule normali. Questo è il grado legato alla prognosi peggiore.

N.B.: Differenza tra differenziato e indifferenziato nelle cellule tumorali:

Le cellule differenziate sono cellule mature che adempiono ad una particolare funzione. Ad esempio, una cellula polmonare è uguale alle altre cellule polmonari e si comporta allo stesso modo. Più una cellula si differenzia, più acquista funzioni specifiche. La crescita abnorme di una cellula può avere inizio ad un qualsiasi stadio del processo di differenziazione. Le cellule anomale (maligne) si distinguono così dalle altre normali, nell'aspetto e nel comportamento. I tumori ben differenziati contengono ancora cellule abbastanza simili alle cellule normali dell'organo nel quale il tumore si è sviluppato. I tumori indifferenziati (de-differenziati o sdifferenziati) sono quelli in cui la maggioranza delle cellule ha un aspetto immaturo e non funziona più come quelle normali. Quando le cellule cancerose crescono e si dividono, diventano sempre meno differenziate fino a perdere tutte le caratteristiche e le funzioni che possedevano quando erano cellule sane. Oltre alle anomalie funzionali, esse si differenziano dalle cellule sane anche per dimensione, forma, e aspetto. Il termine differenziazione viene anche utilizzato per descrivere come le cellule tumorali si presentano rispetto alle cellule normali. Ad esempio, tumori classificati come "ben differenziati" contengono ancora cellule simili alle cellule normali del tessuto da cui hanno avuto origine. Nei tumori "indifferenziati" o "sdifferenziati" le cellule non somigliano più a cellule normali.

- **Grado 1: tumore ben differenziato**
- **Grado 2: tumore moderatamente differenziato**
- **Grado 3: tumore indifferenziato**

I MARCATORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI: Un altro marcatore che viene valutato nella routine clinica del carcinoma della mammella e risulta fondamentale sia livello prognostico che predittivo è la **presenza del recettore estrogenico e del recettore progesterinico**. Il recettore estrogenico fa parte della famiglia dei recettori nucleari.

MARCATORE ER-ALPHA: A livello mammario si trova soprattutto il recettore alfa-estrogenico, che presenta domini strutturali e funzionali tipici dei recettori nucleari:

- Il **dominio di trans attivazione** che è N-terminale.
- La **regione DNA Binding**, che è quella che si lega alle regioni promotrici dei geni che questi recettori vanno a regolare, in particolare il recettore estrogenico si lega alle **sequenze ERE** (*estrogen responsive element*).
- La **regione carbossi-terminale** che è quella che lega l'ormone estrogenico. Quando il ligando si lega al recettore, quest'ultimo funziona come un fattore trascrizionale, perché da qui il recettore interagisce con il promotore e attiva o inibisce la trascrizione del gene.

Meccanismo classico del recettore estrogenico: l'estradiolo passa attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica, va a legare il recettore estrogenico, quest'ultimo si lega alle sequenze ERE e regola la trascrizione, comportandosi proprio come un fattore trascrizionale.

Oltre a questo meccanismo genomico classico, vi è anche un **meccanismo non classico**. Gli estrogeni, legati a troppi recettori, sono in grado di legare anche **sequenze NON-ERE** (C-FOS, C-JUN, SP1), quindi a sequenze di altri fattori. Sono dunque in grado di controllare altri geni coinvolti di influenzare la proliferazione, motilità e angiogenesi. **La via non classica avviene anche in condizioni fisiologiche?** Sì, il

meccanismo classico è quello più utilizzato dal recettore estrogenico, anche se esistono i meccanismi non classici. Oltre a quelli che sono **meccanismi genomici**, in cui i recettori si vanno a legare a sequenze specifiche presenti sui promotori, esiste anche un **meccanismo non genomico** e quindi rapido. Quest'ultimo è mediato da un recettore di membrana, localizzato a livello delle caveole della membrana cellulare, che interagisce con i recettori dei fattori di crescita e quindi attiva poi le vie del segnale (quali le MAP-chinasi ecc.) ed è sempre responsabile di crescita, proliferazione, motilità..

TERAPIA ANTIORMONALE: Gli estrogeni favoriscono l'attività proliferativa. In presenza di un recettore estrogenico positivo è necessario avviare subito una terapia di tipo anti-ormonale, quindi bloccare l'azione degli estrogeni sui recettori. La terapia endocrina che si utilizza può prevedere l'uso di:

-- **SERMs** o **SERDs**. Un classico SERM è il **tamoxifene**, un farmaco antitumorale utilizzato nella terapia del carcinoma mammario. Nello specifico, il tamoxifene compete con l'estradiolo per il legame con il recettore estrogenico. I SERDs vanno invece a regolare l'espressione del recettore estrogenico.

-- **Inibitori dell'aromatasi**, che intervengono sulla sintesi degli estrogeni, quindi vanno a bloccare l'enzima aromatasi per evitare che avvenga la conversione degli androgeni in estrogeni, così da ridurre la quota di estrogeni che va a reagire con il recettore estrogenico. In questo modo si va a ridurre la crescita tumorale.

Nelle pazienti affette da carcinoma mammario, se la donna non è in menopausa, per prima cosa si blocca il ciclo e a questo si associa la terapia anti-ormonale. Se la paziente ha un massimo di quarant'anni si va ad eseguire una terapia anti-estrogenica, in un tumore naturalmente positivo.

L'**ER-alfa** è un marcatore presente nei tumori ER positivi. Quest'ultimi costituiscono dal 60% all'80% dei tumori mammari. Si tratta di marcatori sia prognostici che predittivi positivi. Sono marcatori prognostici positivi perché la presenza del recettore estrogenico è correlata ad una prognosi migliore. I tumori mammari che esprimono il recettore estrogenico, sono quelli legati ad un grado migliore, perché differenziati o moderatamente differenziati. Presentano una sopravvivenza a cinque anni molto elevata, che supera il 90%. Ciò vuol dire che il recettore estrogenico è il marcatore prognostico positivo, un tumore ER positivo ha una prognosi migliore.

N.B.: Quest'ultimo è un marker predittivo perché se si riscontra la presenza del recettore estrogenico, indipendentemente dalla terapia (che sia chirurgica, la radio, la chemio, dipendente dalla stadiazione, dal coinvolgimento linfonodale e dalla dimensione del tumore), in ogni caso, si effettua anche per almeno cinque anni l'**ormonoterapia**, cioè la terapia anche anti-ormonale.

Ovviamente poi la terapia dipende dal soggetto, quindi migliorano la prognosi i tumori ER positivi responsivi all'ormonoterapia. Quello che si è visto in questi anni è che i tumori responsivi all'ormonoterapia possono andare incontro ad **ormonoresistenza**, soprattutto nel caso di tumori altamente eterogenei che evolvono velocemente. Gli studi sono proprio indirizzati a comprendere i meccanismi finalizzati alla resistenza, in modo tale da intervenire anche in tal senso.

IL MARCATORE PROGESTINICO: L'altro marcatore che si studia in parallelo al recettore estrogenico è il recettore progestinico. **N.B.:** in genere, quando si esprime il recettore estrogenico, si esprime anche il recettore progestinico. Di solito sono positivi entrambi. Inoltre, l'1% dei tumori ER negativi possono essere positivi al progesterone. Il recettore progestinico ha lo stesso significato del recettore estrogenico, cioè è un marcatore prognostico positivo, nel senso che la stessa presenza dei recettori progestinici è legata ad una prognosi migliore. Questo è anche un marcatore predittivo perché permette l'utilizzo dell'ormono-terapia.

Come si valutano questi marcatori? Innanzitutto, è necessario specificare che sono marcatori di tipo tissutale, vengono dunque ricercati in seguito all'asportazione del tumore con l'esame citologico.

Si va ad asportare una parte del tessuto sottoposto ad analisi citologiche, quali il **Ligand Binding Assay** e se nel laboratorio viene rilevata la presenza del recettore:

- Si sottopone il tessuto ad immunistochemica (IHC).

- Si va a valutare lo **Staining nucleare** (perché il recettore sia estr. che progest. sono recettori nucleari).

Si valuta, successivamente, lo **Score** e vengono considerati i valori ottenuti positivi o negativi in base al fatto che si superi o meno questo valore soglia. Tutto ciò viene effettuato sempre dall'anatomopatologo che dà informazioni in merito all'espressione di questi recettori. **Ricorda: ER positivo e PgR positivo danno una migliore prognosi e una migliore responsività all'ormonoterapia.**

IL MARCATORE PROGNOSTICO Ki67: Altro marcatore fondamentale è rappresentato da Ki67, un marcatore soprattutto prognostico. Il Ki67 è una proteina nucleare non istonica, che viene espressa durante la fase G1, S e G2 del ciclo cellulare, con un picco durante la mitosi e una mancanza in fase G0. Questo indica il grado di proliferazione del tumore, per cui maggiore è la produzione di Ki67, maggiore è la proliferazione del tumore. Al contrario, tanto più basso è Ki67 migliore sarà la prognosi. La positività a Ki67 è infatti associata a un minore Overall Survival (o sopravvivenza). A differenza delle ER, in base alla sua espressione, tale marcatore, può essere prognostico positivo o negativo.

- Man mano che aumenta la sua espressione diventa un marcatore prognostico negativo.
- Si ha, inoltre, l'interazione di Ki67 con altri marcatori del carcinoma mammario e anche in questo caso è fondamentale considerare il Grading. Se aumenta l'espressione di questo marcatore, aumenta anche il grado del tumore con un passaggio da G1 a G2 a G3.
- Esiste di solito una correlazione inversa con il marcatore ER alfa.
- Esiste poi una correlazione positiva ma non completamente accertata con HER2.

Per classificare se si tratta di un tumore Luminal A o un Luminal B, si va a determinare quanto viene espresso a Ki67. Che sia un fattore prognostico è accertato. Come fattore predittivo, invece, il suo uso è ancora controverso. Potrebbe essere utile per prevedere la risposta alla chemioterapia, ma anche per costatare l'efficacia potenziale di terapie dei candidati per studi di fase III. Anche sulla base di Ki67 si decide se effettuare o meno il trattamento chemioterapico da associare all'ormonoterapia.

Come si valuta Ki67? Sempre sul tessuto, perché si tratta di un marcatore tissutale. Sempre mediante immunoistochimica, quindi rimane fondamentale il lavoro dell'anatomopatologo e l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici. Anche in questo caso, si valuta lo staining nucleare, cioè la presenza del marcatore a livello del nucleo.

MARCATORE PROGNOSTICO E PREDITTIVO: HER2: Un altro marcatore fondamentale prognostico e predittivo del carcinoma della mammella, che permette sempre di effettuare la classificazione molecolare vista in precedenza, è HER2. HER2 è un recettore transmembranario, quindi un recettore ad attività tirosin-chinasica e fa parte della famiglia dei "*recettori dei fattori di crescita*", che non riconosce un ligando specifico.

È costituito da: Una *porzione extracellulare*, che serve per il legame con un ligando - La *porzione transmembranaria*, che attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica - Una *porzione intra-membranaria*, dotata di attività tirosin-chinasica che si lega un fattore di trascrizione che va poi ad attivare una serie di reazioni intracellulari.

HER2 non ha un ligando specifico, ma eterodimerizza con gli altri recettori della famiglia HER (II, III, IV) e poi attiva i signaling a valle, dando origine a una serie di condizioni che aumentano la proliferazione, survival, motility etc... In questo modo, si accelera lo sviluppo e la progressione del processo neoplastico.

Si è visto che l'espressione di **HER2/neu**, si riscontra nel circa 20-30% dei carcinomi mammari e l'espressione di questo recettore è associata a cattiva prognosi, in quanto aumenta la probabilità di recidiva e anche ad un minor tempo di sopravvivenza. Questo è anche un marcatore predittivo, perché risponde meno ad una terapia endocrina in pazienti HER2+ e ER+. È un biomarcatore predittivo, in quanto è bersaglio dell'anticorpo monoclonale (il trastuzumab/herceptin) che si va a allegare al recettore per HER2, bloccandone l'attivazione e conseguentemente anche l'attivazione dei signaling a valle.

Ricorda: è un marcatore prognostico negativo proprio perché un tumore HER2+ ha una prognosi peggiore di un tumore HER-. Però rispetto alle triplo negative ha una prognosi migliore, anche perché dà la possibilità di intervenire con la Target Therapy specifica, utilizzando l'anticorpo monoclonale che va a bloccare il recettore dell'HER2. Herceptin si lega al recettore dell'HER2 e quindi va a bloccare i signaling a valle.

Come si valuta HER2? Si può valutare sia mediante l'immunoistochimica, che mediante la fluorescenza in situ, (tecnica più utilizzata per la sua valutazione nei laboratori e nella pratica clinica), che permette di quantificare in maniera molto precisa la presenza o meno di HER2. HER2+ è un fattore prognostico negativo perché è meno responsivo all'ormonoterapia, però è più responsivo alla chemioterapia. Sicuramente è meglio

essere positivi ad HER2, che essere un triplo negativo (cioè essere negativo ad HER2, al recettore progestinico ed estrogenico), perché in quest'ultimo caso non si può effettuare né l'ormonoterapia né la Target Therapy (cioè l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale). Per questo motivo, essere triplo negativo comporta una prognosi peggiore.

Altri marcatori importanti da identificare nel contesto del carcinoma della mammella sono i **recettori estrogeni e recettori progestinici**; i quali sono strettamente correlati tra loro. Infatti, generalmente, i PR+ sono sempre ER+. Si tratta di marcatori sia prognostici che predittivi:

- **Prognostici** → in quanto la presenza del recettore estrogenico si associa ad una migliore prognosi; infatti, rientra nei tumori Luminal A e Luminal B che sono legati a una maggiore sopravvivenza.
- **Predittivi** → in quanto la presenza del recettore estrogenico indica l'inizio della terapia anti-ormonale; una terapia endocrina basata su ciò che interferisce con l'azione degli estrogeni, ad esempio:
 - ~ **Tamoxifene** che compete con l'estrogeno durante il legame con il recettore estrogenico.
 - ~ **SERD**, regolano l'espressione recettore estrogenico.

HER2 eterodimerizza con gli altri membri della famiglia HER1, HER3 e HER4. Attiva tutta una serie di signaling infra-membranali. Dunque, l'espressione del recettore estrogenico è da un punto di vista prognostico collegato a una peggiore prognosi, in quanto aumenta la probabilità di recidiva e indica un minor tempo di sopravvivenza. HER2 è però un ottimo marcatore predittivo poiché la sua presenza dà indicazioni alla target therapy; in particolare, si utilizzano gli anticorpi monoclonali come il **Trastuzumab** (il cui nome commerciale è Herceptin); questo blocca il legame e l'attivazione del recettore HER2, dunque, blocca ciò che avviene a valle. Per cui i tumori HER2+: Hanno una peggiore prognosi, Sono meno responsivi all'ormonoterapia, Sono più responsivi alla chemioterapia & Rispondono al Trastuzumab.

Altri marcatori prognostici predittivi entrati più recentemente nella pratica clinica, grazie ai progressi della biologia molecolare e in particolar modo nell'ambito della genomica, è la **valutazione dell'espressione di alcuni geni**. Ad esempio, a livello del tessuto mammario l'espressione di questi geni è associata ad una determinata prognosi; questi geni possono essere anche utilizzati come marcatori predittivi, in quanto forniscono indicazioni rispetto alla risposta terapeutica. Si tratta di **testi multi-parametrici** in cui sono presenti su un determinato pannello più geni che vengono contemporaneamente analizzati; ne esistono oggi di diversi tipi, quelli più utilizzati sono:

- **OncotypeDX RS**: analizza contemporaneamente 21 geni; è predittivo, ad esempio, del beneficio di aggiungere la chemioterapia ai pazienti che già effettuano terapia endocrina, ossia pazienti con carcinoma ER+, HER2-.
Viene particolarmente utilizzato dallo Stadio 1 allo Stadio 3 che sono ER+/ER-, e così via.
- **MammaPrint**: analizza 70 geni.
- **Prosigna**: analizza 50 geni.
- **EndoPredict**: analizza 12 geni. Viene particolarmente utilizzato quando si è in presenza di tumori Stadio 1 o Stadio 2 che sono ER+/PR+.
- **BCI (Breast Cancer Index)**: analizza 11 geni.

Altro tipo di marcatore di tipo prognostico e predittivo, che può essere effettuato sia sul tessuto e che in circolo, è rappresentato dai **miRNAs**: si è visto che questi possono ricoprire un importante ruolo sia come marcatori prognostici che come marcatori predittivi. Tuttavia, sono ancora in parte in fase di sperimentazione, in quanto risultati che si ottengono non hanno ancora raggiunto un'importanza tale da essere utilizzati nella pratica clinica. Altro sono le **cellule circolanti**, ossia rilevati attraverso biopsia liquida (in particolar modo è utilizzato il sangue). La presenza di cellule tumorali circolanti può essere utilizzata sia come marcatori prognostici che predittivi; in realtà, ci sono ancora studi in corso, si riscontra infatti una difficoltà: si ottiene un numero troppo basso e quindi il risultato non può essere valutato come attendibile.

Altri markers sono i **ctDNA**: Questi provengono sempre dalle cellule circolanti e vengono utilizzate nell'ambito del carcinoma mammario per rilevare le mutazioni del gene che codifica per il recettore estrogenico: **gene ESRI**. In quanto, si è visto che possono essere presenti delle mutazioni nella regione **Hormon Binding-Domain**, le quali inoltre risultano essere più frequenti nei carcinomi mammari metastatici rispetto a quelli primitivi. Quindi, si possono ricercare specifiche mutazioni già identificate, tra le più

frequenti ricordiamo: *y537S*, *y537N* e *D538G-ERalfa*. La presenza di queste mutazioni nel recettore estrogenico è responsabile di un cambiamento conformazionale del recettore estrogenico-alfa e, le cellule che presentano queste mutazioni del recettore estrogenico risultano più resistenti ai classici trattamenti ormonali. La terapia ormonale dà ottimi risultati nei pazienti con carcinoma mammario con recettore estrogenico positivo; tuttavia, si rilevano dei limiti come la resistenza alla terapia ormonale. Sono diversi i meccanismi coinvolti nella resistenza ormonale, uno di questi è proprio la comparsa di mutazioni nella regione del Hormon Binding-Domain. Per cui, potrebbe essere utile ricercare la presenza di queste specifiche mutazioni (mediante ctDNA) nei pazienti con carcinoma che diventa resistente alla terapia ormonale; in quanto, in questo caso, si renderebbe necessario trovare altri trattamenti.

Altri marcatori vengono misurati nei tumori metastatici, nei tumori più avanzati e nei tumori triplo negativi. Si tratta di marcatori per lo più predittivi, ossia utili a comprendere la risposta al trattamento terapeutico. Tali tumori non rispondono alla target therapy e l'ormonoterapia per cui bisogna intervenire solo con la chemioterapia. Tra questi marcatori vi sono:

- **PD-L1** → è importante valutarne l'espressione sulle cellule tumorali; viene effettuato su tumori triplo negativi e valutato attraverso immunoistochimica. È importante valutare la percentuale di PD-L1 presente in quanto si è visto che in questi pazienti si può utilizzare anche l'immunoterapia.

L'immunoterapia può essere anche associata alla chemioterapia così come può essere utilizzata singolarmente, il che è un bene in quanto l'immunoterapia ha effetti collaterali nettamente minori rispetto a quelli della chemioterapia.

- **PIK3CA mutation.**

Tra le mutazioni ricercate nei tumori ER+ e HER2- (tumori più avanzati che iniziano a presentare metastasi) è la mutazione di PIK3CA. La presenza di questa mutazione può rappresentare un indice predittivo; in quanto, i pazienti possono rispondere bene alla terapia ormonale, possono associare a quest'ultima una seconda terapia che blocca ciò che è a valle dell'attivazione della PI3-chinasi. O ancora, la ricerca di microsatelliti o il test del TMB fondamentali per tutti i tipi di tumori metastatici. L'analisi di questi markers evidenzia i benefici dell'immunoterapia; infatti, nei pazienti in cui si riscontrano queste alterazioni, nel momento in cui la chemio non funziona, si può iniziare un trattamento basato sull'immunoterapia che, anche se non guarisce dal tumore, lo cronicizza e allunga i tempi di sopravvivenza. Le fusioni delle **NTRK** possono essere valutate mediante **FISH**; anche questi rispondono ad inibitori delle tirosin-chinasi. Altri profili genomici più ampi possono essere effettuati mediante la *Next Generation Sequence* in tutti i tipi di tumore; in particolare, la si effettua nei tumori sui quali non si sa bene quale terapia applicare e perciò quelli metastatici e in stadi avanzati. È così possibile individuare eventuali altri geni, poi targettizzati, per dare avvio ad una target therapy.

L'IMPORTANZA DI BRCA1 E BRCA2: In tutti i tipi di tumori metastatici può essere ricercata la mutazione dei due oncosoppressori **BRCA1** e **BRCA2**; sono oncosoppressori mutati nelle forme ereditarie dei tumori della mammella e riguardano, però, una percentuale bassissima di forme di tumore. Le mutazioni di questi due oncosoppressori indicano una buona risposta al **MAP inhibitor**; quindi, in presenza di BRCA1 e BRCA2 positivi, si possono utilizzare gli inibitori MAP.

- **BRCA1** è localizzato sul cromosoma 17 e presenta nelle forme ereditarie una trasmissione autosomica dominante. Sono state identificate circa 500 differenti mutazioni, responsabili di più del 50% dei tumori ereditari della mammella (riguardano comunque una piccola fetta di carcinomi mammari). La presenza di queste mutazioni aumenta, inoltre, il rischio di carcinoma ovarico, di carcinoma al colon e nell'uomo del carcinoma prostatico.
- **BRCA2** è un gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 13, la sua trasmissione è autosomica dominante e sono state identificate circa 300 differenti mutazioni. Una mutazione del BRCA2 è responsabile di circa il 70% dei tumori ereditari non causati da BRCA1. La presenza della mutazione di BRCA2 aumenta il rischio di tumore alla mammella nell'uomo (rarissimo ma altamente aggressivo).

Le mutazioni più frequenti sono causate da BRCA1, le restanti (circa il 70%) da BRCA2.

Attualmente anche in pazienti metastatici è possibile effettuare Target Therapy, ricercando altri markers che possono essere utilizzati come marcatori predittivi. In particolare, per gli ER+ che non rispondono solo alla terapia ormonale si associa, come prima linea, la terapia per gli inibitori della CDK-4/6, inibitori entrati nella routine del trattamento del carcinoma della mammella.

Quindi il primo trattamento si basa su **CDK Inibitors** e se la malattia persiste con una situazione di carcinoma metastatico avanzato, viene ricercata la mutazione della **PI 3-chinasi** e se è presente questa mutazione si associa la terapia specifica. Nei tumori HER2+ si utilizzano gli anticorpi specifici che bloccano il recettore HER2 e la chemioterapia. Nei pazienti con recettore estrogenico negativo ed HER2-, quindi i tripli negativi (prima trattati solo con la chemioterapia) oggi si dosa il PD-L1 tramite immunoistochimica. Dopo il suo dosaggio e in base ai valori ottenuti, può essere utilizzata la terapia basata sul suo inibitore e quindi l'immunoterapia associata alla chemioterapia. Come option si possono testare **microsatelliti** o il **TMB**, che rispondono sempre bene all'immunoterapia. Per tutti gli altri tipi di carcinoma metastatico può essere utile valutare la mutazione di BRCA1 e BRCA2 che rispondono bene agli inibitori del **PARP**; o ancora, andare a testare eventuali nTRK fusio (rispondono bene agli inibitori delle tirosin-chinasi) o qualunque altro tipo di espressione genica che potrebbe evidenziare altri geni marcatori che possono essere targettizzati.

MARCATORI TUMORALI NEL FOLLOW UP: Insieme agli esami strumentali servono per valutare l'andamento e l'evoluzione del tumore della mammella. Questi sono marcatori sono più semplici da dosare rispetto ai precedenti, in quanto si dosano su siero e quindi i loro valori possono essere rilevati in qualunque momento e ripetuti dinamicamente nel tempo. Nella fase iniziale del tumore, la loro specificità e sensibilità è notevolmente bassa. Nel corso del tempo tendono ad aumentare la loro concentrazione, vengono rilevati quando il tumore si trova in fase avanzata. Il loro dosaggio è richiesto:

- Nel momento in cui si fa diagnosi solo per avere un bilancio di base, quindi per capire il valore del marcatore allo stadio iniziale (potrebbe essere anche completamente negativo).
- Vengono, poi, utilizzati soprattutto nella valutazione post-operatoria.
- Quando si inizia il trattamento specifico e preciso per monitorare l'evoluzione della malattia durante il trattamento del paziente e anche l'efficacia del trattamento farmacologico stesso.
- Sono utili anche insieme agli esami strumentali per rilevare precocemente eventuali recidive.

Quali sono i marcatori tumorali che si utilizzano nel follow up del carcinoma mammario?

- Le mucine, in particolare il **CA15.3**, poi abbiamo il **CA27.29** e il **CA549**.
- Le **molecole di adesione CEA**, un marcatore non specifico del carcinoma mammario, in quanto si può risultare CEA+ per altri numerosi tipi di tumori.
- **Citocheratine TPA**, usati come marcatori alternativi alle mucine.
- Più recentemente è stato possibile dosare l'**HER2 ECD**, cioè la porzione extracellulare del recettore HER2, che si è visto essere clivata e quindi immessa nel siero. Quindi può essere dosata anche su siero.

LE MUCINE E L'IMPORTANZA DI CA15.3: Le più utilizzate sono le **mucine**, delle lipoproteine ad elevato peso molecolare costituite da una proteina non globulare (che è l'**apomucina**) con catene oligosaccaridiche ad essa legate (la % di zuccheri >80% del peso molecolare). Sono secrete da cellule secernenti dei tessuti di origine epiteliale e vengono poi riversate sulla superficie libera dell'epitelio.

La mucina più utilizzata come marcatore di follow up del carcinoma mammario è il **CA15.3**:

È **Mucin-like carcinoma associated antigen** o antigene carboidratico mucinoso. È una glicoproteina di tipo mucinoso. Ha un peso molecolare di 300-400 kDa. È presente sulle cellule alveolari e sulle cellule dei dotti ghiandolari sia normali che su quelli neoplastici. Appartiene alla famiglia delle MUC1 o PEM.

Concentrazioni plasmatiche: valori di riferimento 0-30 U/ml, Cut-off: 35 U/ml.

La ricerca di CA15-3 risulta soprattutto utile negli stadi avanzati del tumore. Si è visto che presenta una sensibilità notevolmente bassa nelle forme locali e in forme localmente avanzate. Quindi in uno stato iniziale, quando il tumore non è ancora in una fase metastatica, ha una sensibilità estremamente bassa e quindi è possibile trovare un paziente con carcinoma mammario con un CA15.3 negativo. Non è assolutamente utile nelle fasi diagnostiche. Infatti, si vede come la sensibilità aumenti man mano che aumenta lo stadio del tumore. Si passa da una sensibilità del 10% in uno Stadio 1, allo Stadio 2 che presenta una sensibilità che rientra nel 15-20%, ad uno Stadio 3 del 39%, fino ad arrivare ad una sensibilità notevolmente elevata quando il tumore arriva ad uno Stadio 4 (tumore metastatico) con l'80%. È molto utile, quindi, sia ad uno stadio avanzato, che per riconoscere precocemente una eventuale recidiva. In un paziente in cui è avvenuta la diagnosi di carcinoma alla mammella, la presenza di un eventuale recidiva viene rilevata da una positività del CA15-3. Anzi è possibile positivizzarsi anche prima di risultare positivi all'esame di

tipo strumentale. È quindi importante dosarlo nel follow-up. Il CA15.3, ma anche altre mucine, sono importanti per valutare la risposta al trattamento terapeutico, in quanto è possibile avere una predittività dato che c'è un parallelismo con la risposta clinica.

Quali sono i limiti del CA15-3? Come altri marcatori in generale, aumentano in diverse neoplasie e quindi non è specifico ed esclusivo del carcinoma alla mammella. Esso è possibile aumenti nel carcinoma polmonare, ma anche in quello prostatico, oppure in malattie non neoplastiche come l'epatite cronica e malattie infiammatorie dell'apparato respiratorio. Quindi si possono avere anche dei falsi positivi, non congruenti con la realtà.

MCA: Mucin-like carcinoma associated antigen o antigene carboidratico mucinoso. Glicoproteina di tipo mucinoso, PM 350 kD, prodotta a livello dell'epitelio dei dotti ghiandolari mammari normali o neoplastici. Appartiene alla famiglia delle *MUC1* o *PEM*. Concentrazioni plasmatiche: Valori di riferimento: 0-14 UI/ml; Cut-off: 12 UI/ml. La sua concentrazione è correlata con l'estensione della malattia, il numero dei linfonodi coinvolti e le sedi delle metastasi. Elevati livelli sierici sono presenti nel 20% dei tumori localizzati e nel 78% di quelli metastatici.

Impiego: Monitoraggio dei pazienti dopo terapia medica e/o chirurgica. Diagnosi precoce della malattia residua e delle recidive occulte.

Limiti: Questo tipo di marcatore aumenta in altre neoplasie (20% carcinomi del colon, 44% carcinomi ovarici, 40% carcinomi polmonari). Aumenta anche in patologie non neoplastiche (malattie polmonari croniche, cirrosi, insufficienza renale).

CEA: Antigene carcinoembrionario. Glicoproteina monomerica, PM 150-300 kD, con componente glucidica 45-60% prodotta normalmente dal tessuto intestinale, pancreatico e dal tessuto epatico durante l'embriogenesi. Appartiene alla famiglia delle immunoglobuline. Molecola d'adesione coinvolta nei meccanismi di riconoscimento intercellulare, fondamentali nei processi di regolazione della crescita e della differenziazione. Concentrazioni plasmatiche: Valori di riferimento: 0-3 ng/ml, Cut-off: 30 ng/ml.

N.B.: nei fumatori i livelli possono salire fino a 10 ng/ml, determinando falsi positivi non correlati alla presenza di una neoplasia.

- È espresso in quantità elevate durante la vita intrauterina ed in tutte le condizioni in cui è esaltata la proliferazione cellulare, come appunto nei processi neoplastici.
- Si associa con la presenza di metastasi e con una cattiva prognosi.

Impiego: Monitoraggio dei pazienti dopo terapia medica e/o chirurgica. Diagnosi precoce della malattia residua e delle recidive occulte.

Limiti: Aumento in altre neoplasie (tumori polmonari non a piccole cellule e colon-retto). Aumento in patologie non neoplastiche (malattie infiammatorie intestinali, pancreatiti, gastriti, bronchiti).

TPA: Antigene polipeptidico tessutale, PM 10-50 kD. Appartiene alla famiglia delle citocheratine. Più che rappresentare un marcatore specifico di una patologia tumorale, è un marker di proliferazione: viene liberato nel plasma dalle cellule epiteliali in duplicazione. Concentrazioni plasmatiche: Valori di riferimento: 0-80 U/ml, Cut-off: > 90 U/ml. È correlabile non tanto all'estensione della massa neoplastica, ma alla sua attività proliferativa. Aumenta nei tumori più aggressivi. È dosabile nel siero e nelle urine.

Impiego: Monitoraggio dei pazienti dopo terapia medica e/o chirurgica in associazione con altri marcatori organo-specifici. Valutazione dell'attività proliferativa di una neoplasia accertata; anche se per la proliferazione si utilizza principalmente P67, che dà un indice molto più preciso.

Limiti: Aumento in altre neoplasie (tumori aggressivi del tratto gastroenterico, genitourinario, tiroideo e polmonare). Aumento in patologie non neoplastiche (epatiti, cirrosi, infezioni delle vie urinarie) e in caso di abuso di alcol.

HER2 ECD: È un recettore di membrana che attraversa il doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica, costituito da tre porzioni: Una extracellulare che permette il legame con il ligando - Una intramembranosa che attraversa la membrana. - Una intracellulare dotata di attività tirosin-chinasica, che si attiva ogni volta che il ligando si lega al recettore.

La proteina HER2/neu ha tre domini, compreso un dominio extracellulare (ECD= extracellular domain) da 105 kDa che viene clivato e rilasciato dalle cellule tumorali nel sangue. Pertanto, può essere quantificato nel siero (sHER2 ECD). Esiste una correlazione tra i livelli circolanti di HER2, quindi del dominio extracellulare nel siero, e la sua espressione tissutale; La presenza di HER2, oltre ad essere indice di una prognosi peggiore, permette di utilizzare la target therapy.

- **Marker prognostico:** sHER2 ECD elevato alla diagnosi si associa a malattia metastatica e ridotta OS; la sua espressione nel siero aumentata durante il processo metastatico: 15% delle pazienti con carcinoma mammario primario ha livelli elevati di HER2 ECD nel siero (sHER2 ECD), i livelli raggiungono il 45% nelle pazienti con malattia metastatica.
- **Marker predittivo:** Nei pazienti metastatici, una riduzione di almeno il 20% di sHER2 ECD dopo terapia con trastuzumab ha mostrato un tasso di risposta più elevato, un tempo di progressione più lungo e DFS e OS più lunghe.