

Proteinograma

Proteínas de fase aguda

Profa Viviani Gomes

Patologia Clínica Veterinária

VCM 4102

11.4.23



Introdução



Avaliação das proteínas

Na rotina clínica é parte integrante
perfil bioquímico

Corrobora com diagnóstico,
resposta à terapia e prognóstico do
paciente



FIGURE 5-5 The molecular structure of human serum albumin (Curry *et al.*, 1998). Note the high proportion of α -helices. Figure generated by Rasmol from UniProt Accession number P02768 and protein database entry 1N5U.

Soro e Plasma



Plasma, separação líquida do sangue não coagulado, contém todas as proteínas

Soro, Fração líquida do sangue resta após a coagulação, o que requer conversão do fibrinogênio em fibrina, portanto o soro não contém fibrinogênio, mas sim albumina e demais globulinas

Outro tipo de material clínico: derrames cavitários, líquido sinovial, liquor, colostro, leite, dentre outras secreções e excreções



c/ EDTA = Plasma

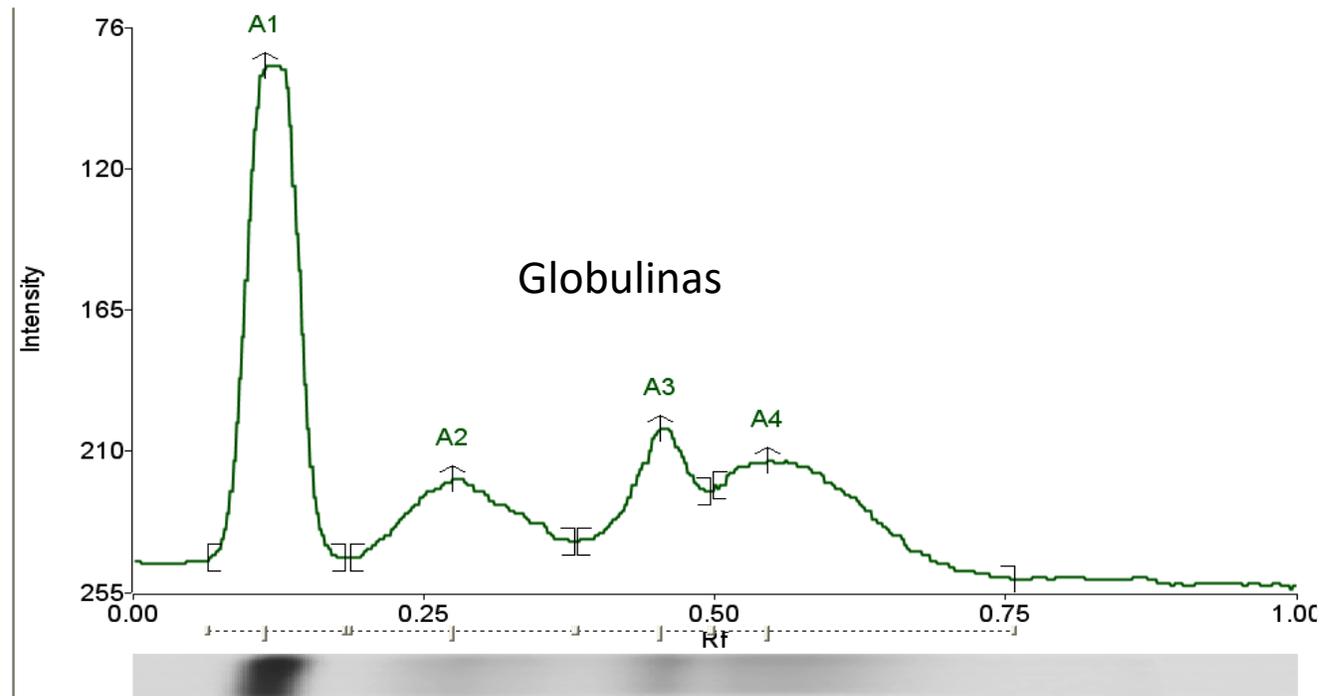


s/anticoagulante = soro

Proteínas sanguíneas



Dois principais tipos: albumina e globulinas



Albumina

Proteínas sanguíneas



Albumina

Proteína pequena

35 a 50% da proteína sérica total (> globulinas)

Funções:

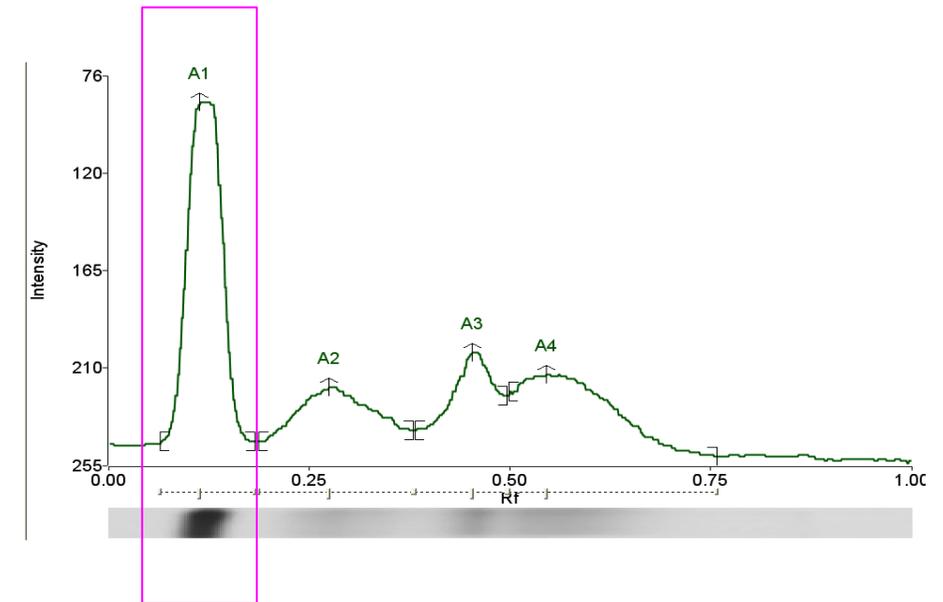
1. Pressão colóide- osmótica sanguínea (70-80%)

2. Proteína transportadora

ácidos-graxos livres

ácidos biliares

bilirrubina, cálcio, hormônios e medicamentos



Sintetizada fígado, disponibilizada na corrente sanguínea e metabolizada na maioria dos tecidos. Meia-vida variável de 8 dias (cães) a 20 dias (equinos)

Proteínas Séricas

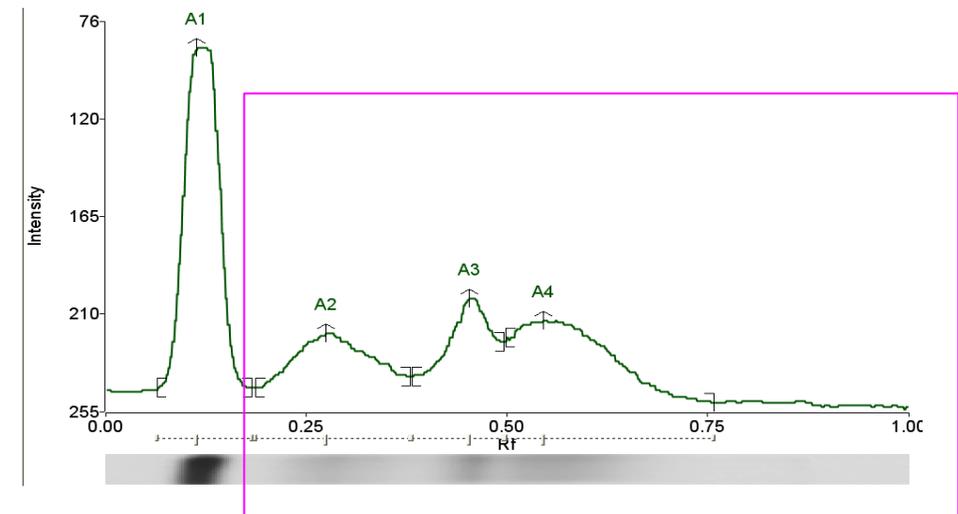


Globulinas

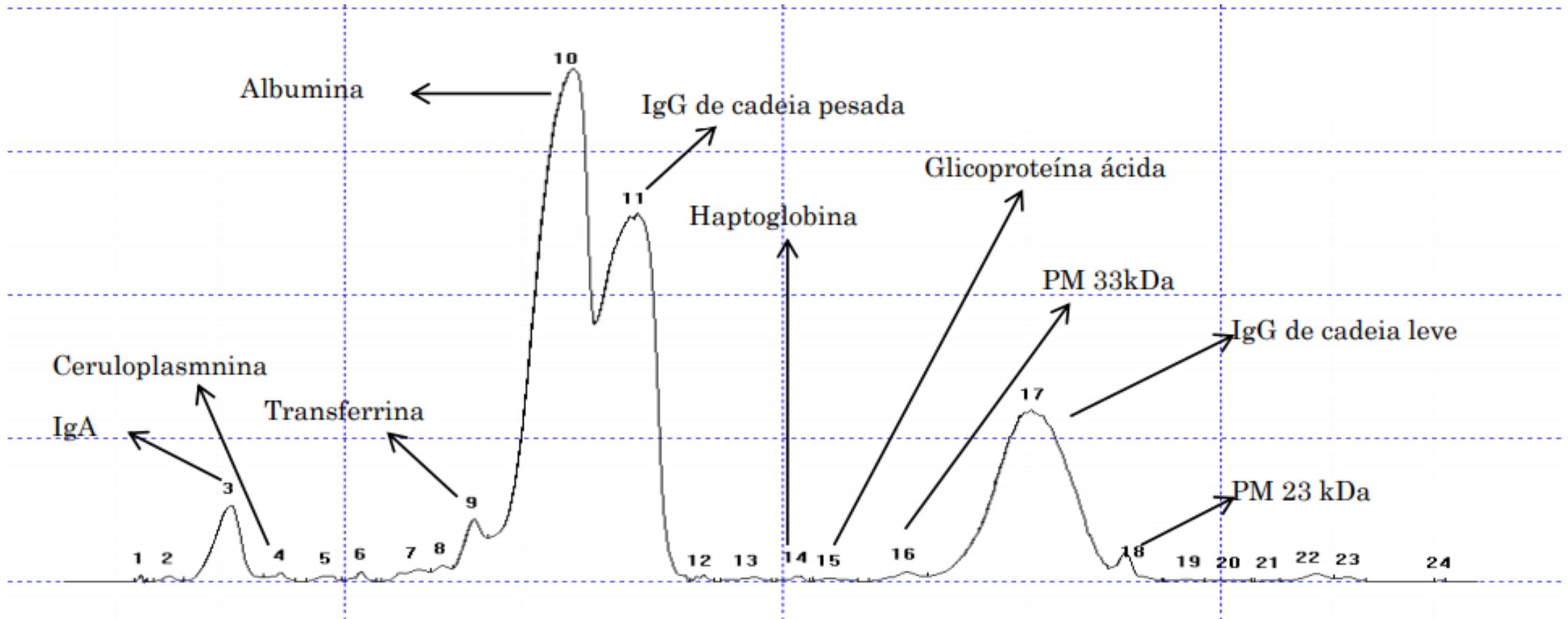
Grupo heterogêneo

Proteínas grandes, com diferentes tamanhos e pesos moleculares

Classificadas nas frações alfa, beta ou gama-globulinas

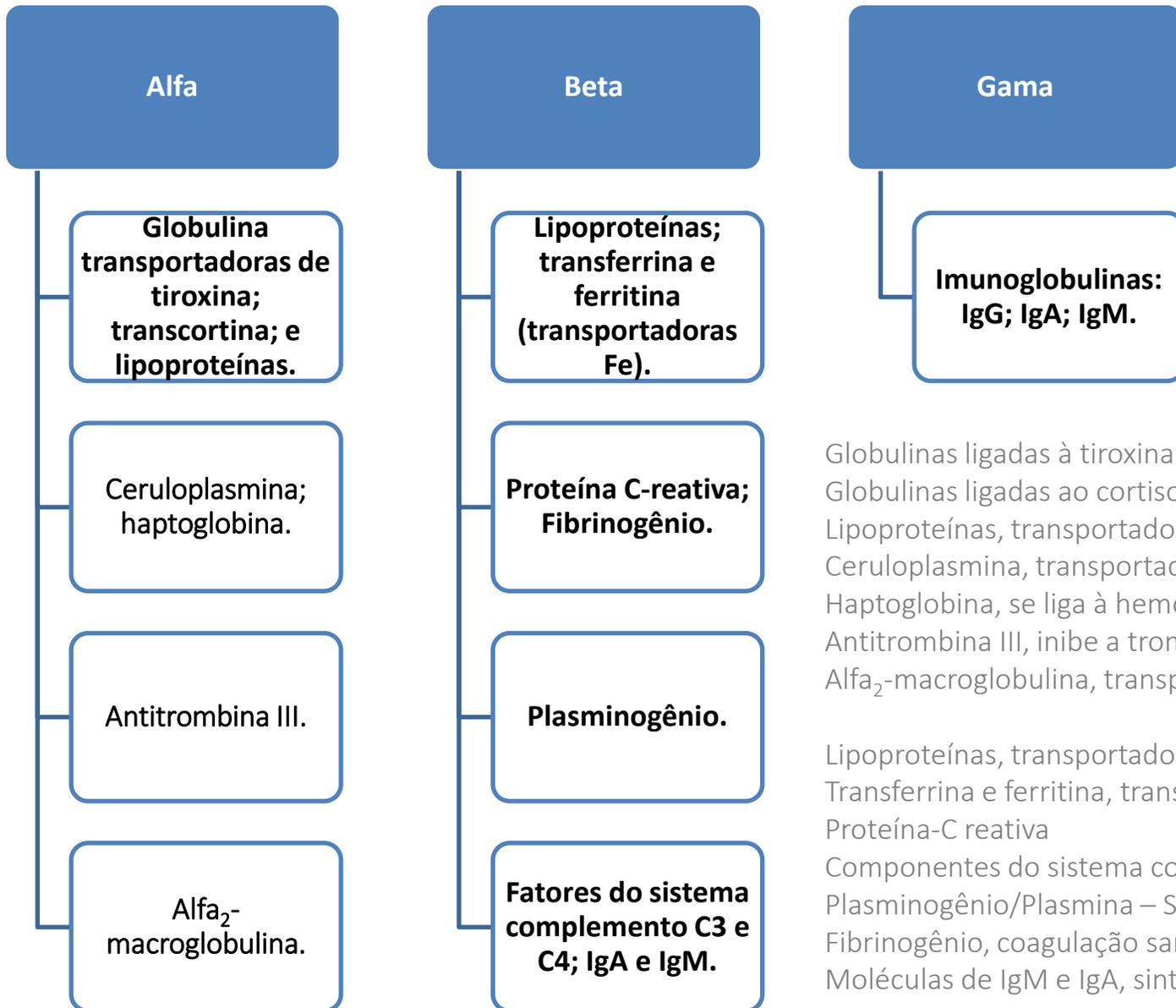


Eletroforese em gel de poliacrilamida, demonstrando a heterogeneidade das frações, alpha, beta e gamma globulinas



Fonte: Thais Rocha

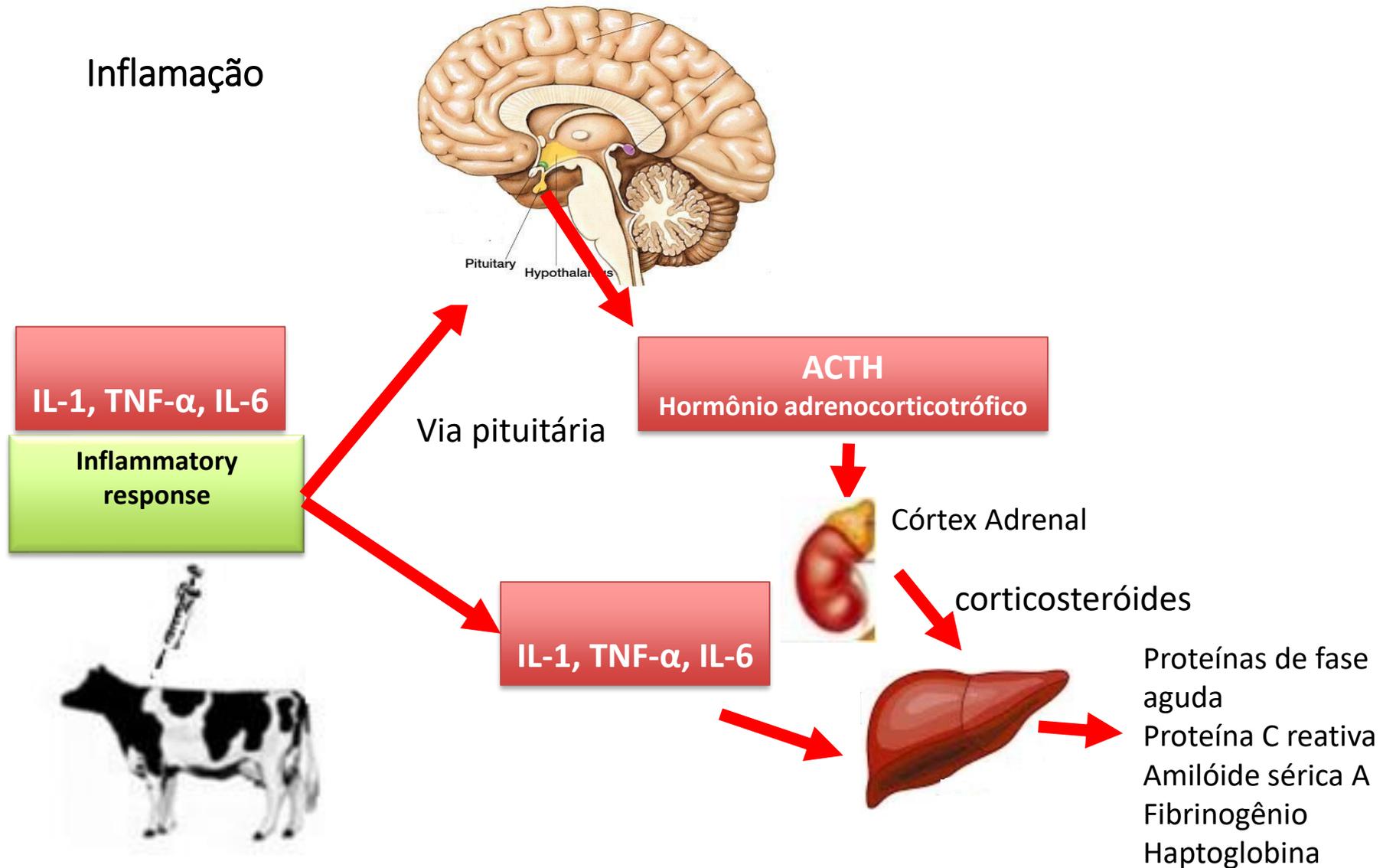
Frações eletroforéticas e sua composição



Globulinas ligadas à tiroxina (T4), transportadora de tiroxina
Globulinas ligadas ao cortisol, transcortina
Lipoproteínas, transportadora de lipídeos
Ceruloplasmina, transportadora de cobre
Haptoglobina, se liga à hemoglobina
Antitrombina III, inibe a trombina
Alfa₂-macroglobulina, transportadora de hormônios (insulina) e inibe proteases (tripsina)

Lipoproteínas, transportadora de lipídeos
Transferrina e ferritina, transportadoras de ferro
Proteína-C reativa
Componentes do sistema complemento C3 e C4
Plasminogênio/Plasmina – Sistema fibrinolítico
Fibrinogênio, coagulação sanguínea e resposta inflamatória
Moléculas de IgM e IgA, sintetizadas nos tecidos linfóides em resposta estímulos antigênicos

Proteínas de fase aguda



Proteínas de Fase Aguda



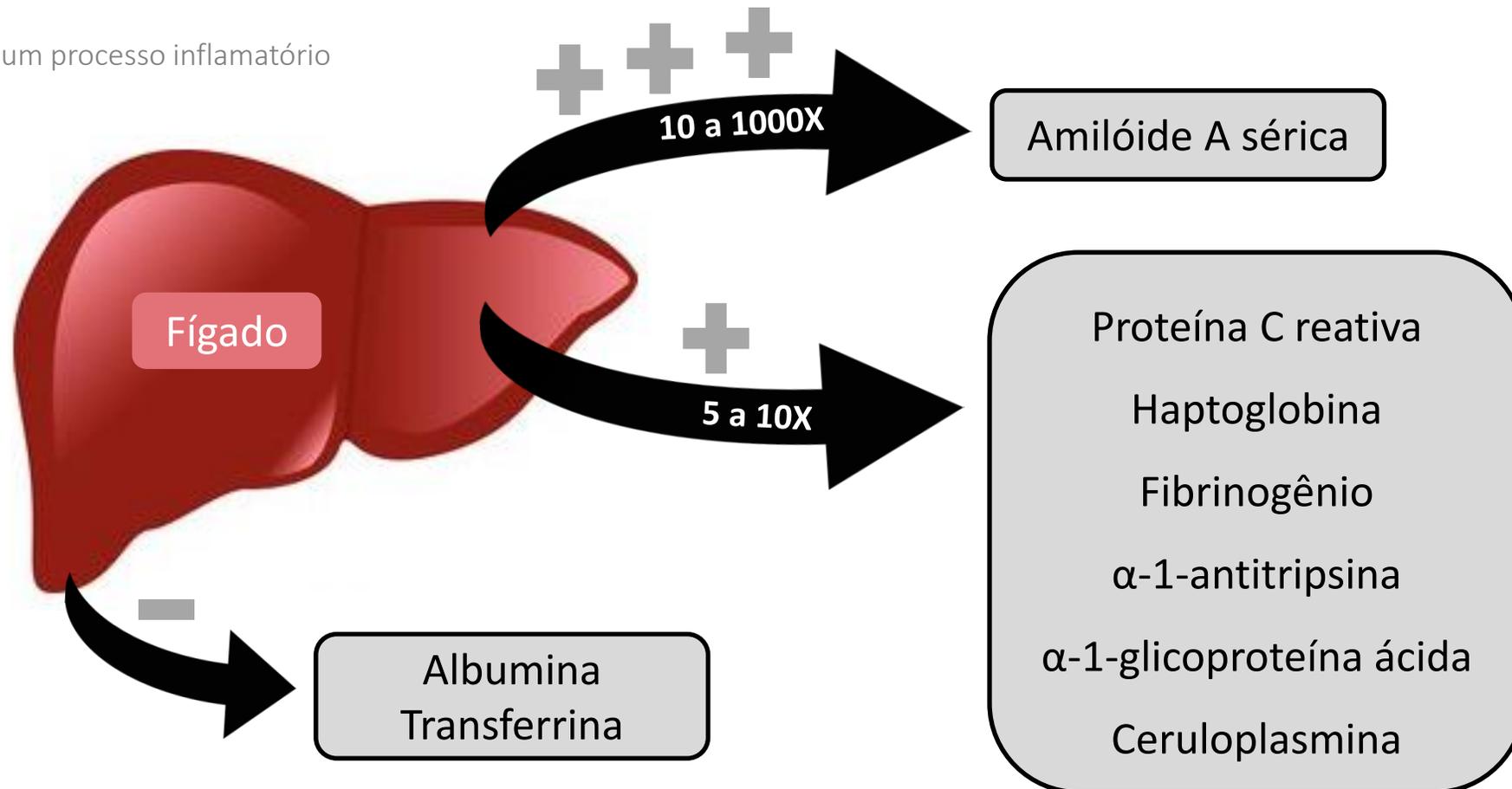
Classificadas em Positivas ou Negativas

POSITIVAS

Aumento de 5 a 1.000x em relação aos valores basais

NEGATIVAS

Abauio do valor basal diante de um processo inflamatório





Espécie	PFA principal	PFA moderada
Gato	Amilóide sérica A	Glicoproteína ácida e Hp
Vaca	Hp e Amilóide sérica A	Glicoproteína ácida
Cão	Proteína C reativa e Amilóide sérica A	Hp, Glicoproteína ácida e Ceruloplasmina
Cavalo	Amilóide sérica A	Hp
Camundongo	Amilóide sérica A	Hp e Glicoproteína ácida
Suíno	Proteína C reativa	Hp e Ceruloplasmina
Rato	Alpha2- macroglobulina	Hp e Glicoproteína ácida

Fonte: Kaneko

Mensuração proteínas



Proteína total

- teste bioquímico por espectrofotometria
 - Método do Biureto

Albumina

- teste bioquímico por espectrofotometria
 - Método de verde bromocresol

de valores entre a proteína determinada pelo refratômetro e método do Biureto

Métricas Importantes



✓ **Globulina = Proteína total - albumina**

✓ **Relação Albumina:Globulina**

Normal, se ambas as frações se encontrarem uniformemente alterados

Anormal, quando predomina a alteração em uma das frações

$A:G \leq 0,5$ = Cirrose hepática

Refratometria



Determinação da proteína total

Refratômetro, escala de 0 a 12

Método simples, rápido e de baixo custo para detecção de hiper e hipoproteïnemia

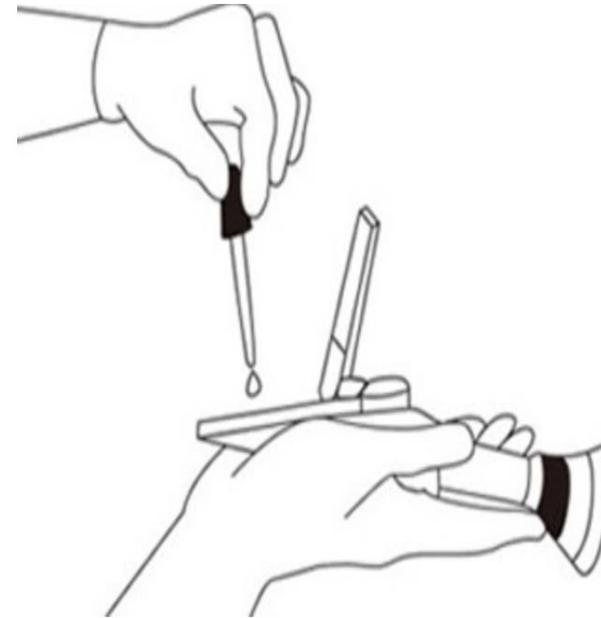
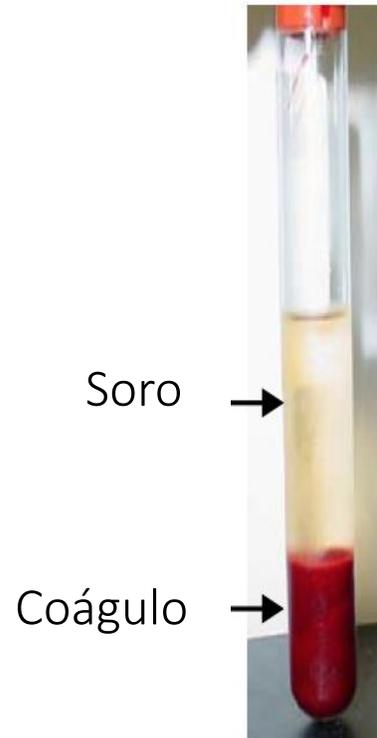
As moléculas de proteína provocam aumento do índice de refração proporcional à concentração da amostra

Interferências (FALSA ELEVAÇÃO)

Hemoglobina ou bilirrubina, lipídeos e aumento da concentração de solutos (glicose, uréia, sódio e cloretos)



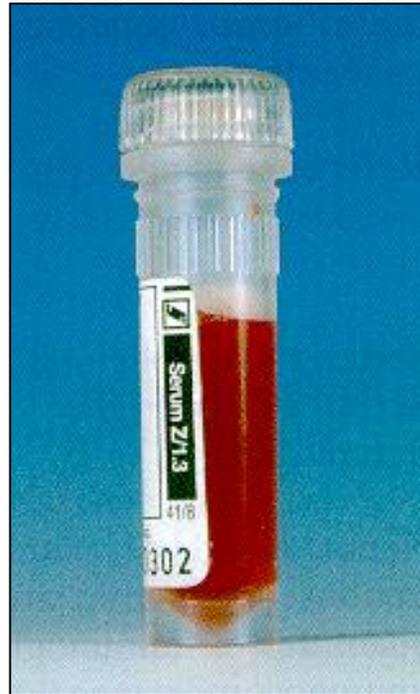
Determinação da PT por refratometria



Coagulação temperatura ambiente
Centrifugação soro
Centrifugação capilar hematócrito

Adicionar uma gota do soro no prisma do refratômetro

Interferências



Hemólise



Hiperlipidemia



Hiperbilirrubinemia



Equino, mestiço, macho, idade 2 anos

Proteína total (g / dL)	7,8	(7,0 a 7,50)
Albumina (g/dL)	3,5	(3,0 a 3,5)
Fibrinogênio (mg /dl)	400	(200 a 400)

1. Proteína sérica ou plasmática?
2. Hemólise? Hiperbilirrubinemia? Lipemia?
3. Hemoconcentração ?
4. Aumento da síntese de proteínas?

Processo hemolítico



Equino, mestiço, macho, idade 2 anos

Proteína total (g / dL)	7,8	(7,0 a 7,50)
Albumina (g/dL)	3,5	(3,0 a 3,5)
Fibrinogênio (mg /dl)	400	(200 a 400)
Hemácias (x 10 ⁶ /uL)	4,90	(7,0 a 7,5)
Hematócrito (%)	22	(32 a 35)
Hemoglobina (g/dL)	9,5	(11,0 a 13,0)
VCM (fL)	44,8	(42 a 50)
HCM (pg)	19,3	(14,7 a 18,5)
CHCM (%)	43,0	(31 a 38)

Mensuração das Globulinas



Principal método, eletroforese

Arne Tiselius (Prêmio Nobel, 1941)

Determinação das concentrações de ALB e GLOB por fracionamento eletroforético



Selo Postal Sueco, 1983

Mensuração das Globulinas



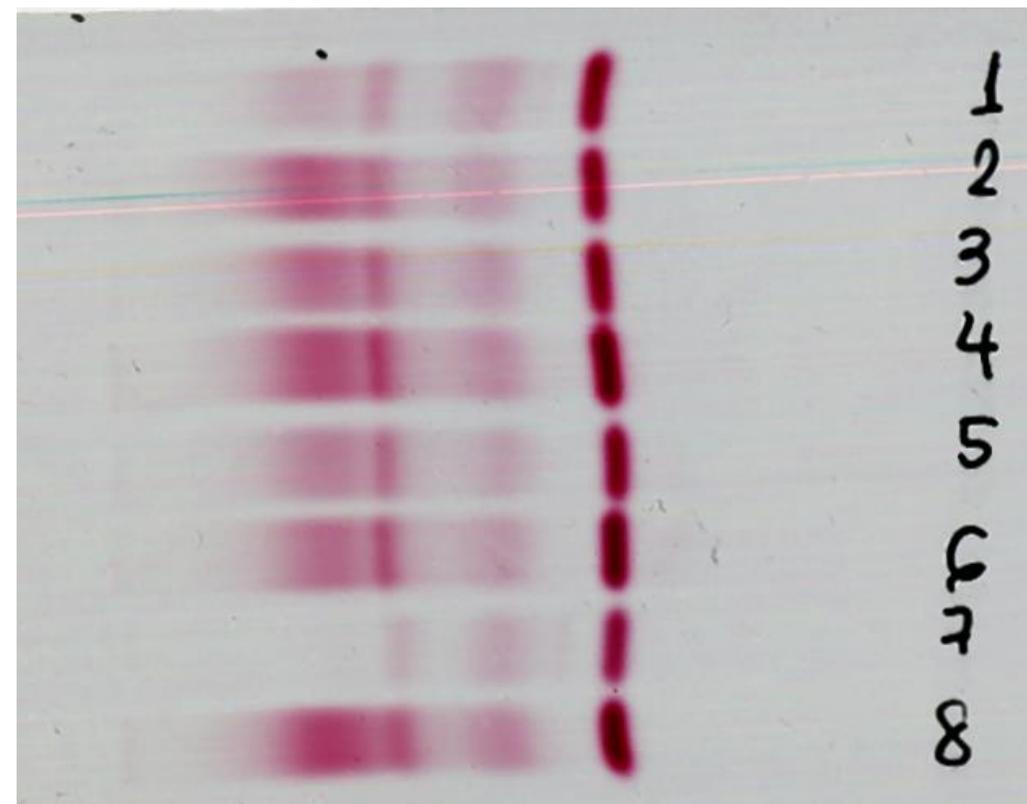
Principal método, eletroforese

Princípio:

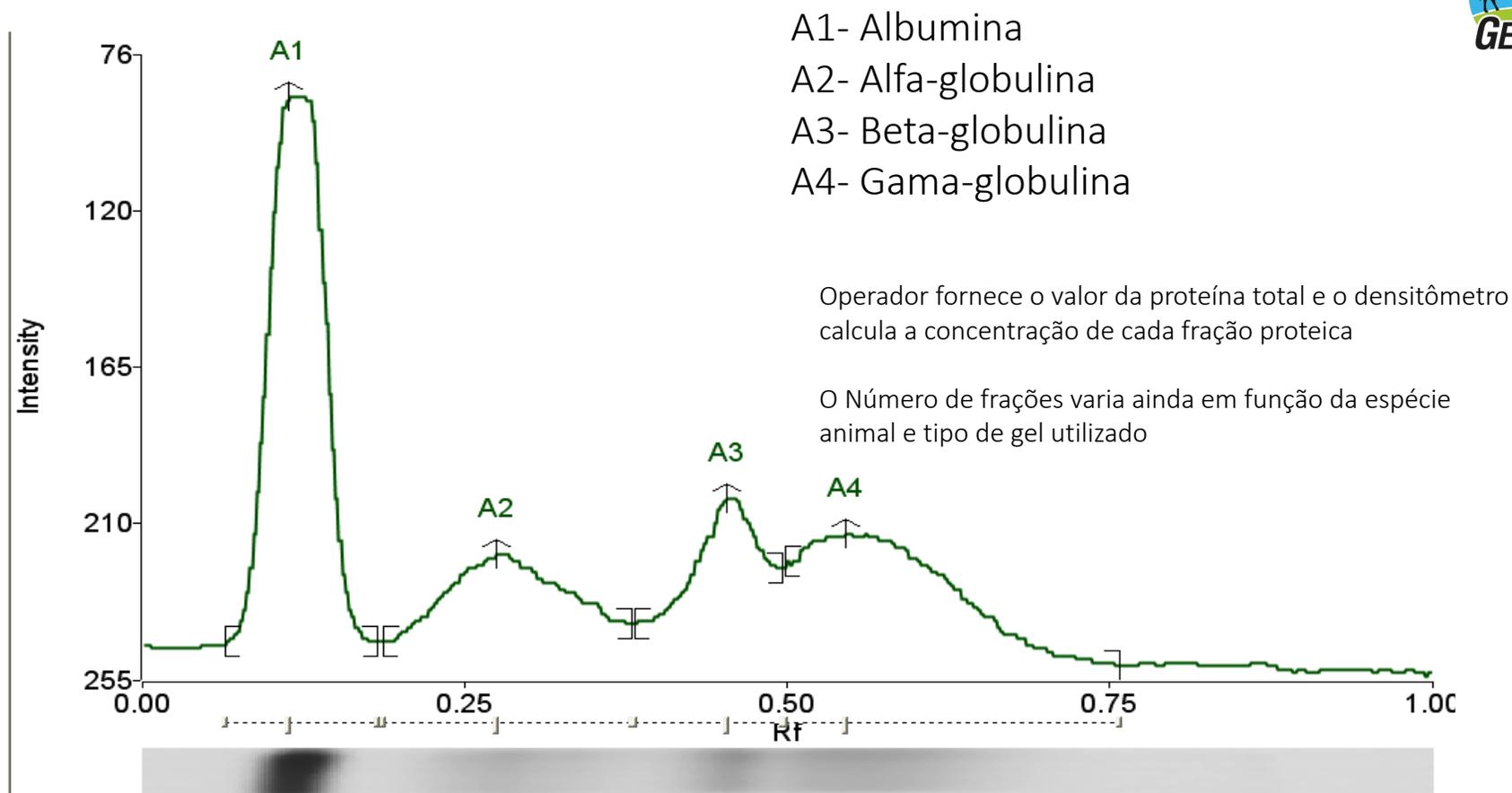
1. Aplicação da amostra de soro na extremidade de uma fina placa de gel;
2. Gerar um campo elétrico para a corrida das proteínas em direção à carga oposta (do Neg ao Pos);
3. Coloração do gel;
4. Leitura do gel em um espectrofotômetro (densitômetro com escâner), obtendo-se um traçado eletroforético



Corrida eletroforética das proteínas séricas do soro de bezerros, em fitas de acetato de celulose a 220V, por 35 minutos.



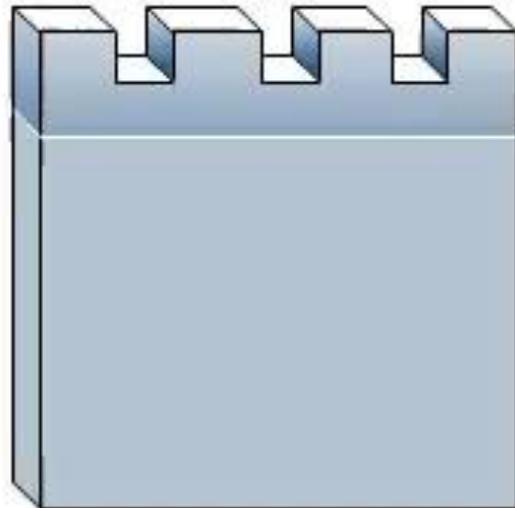
Fita de acetato celulose corada



Eletrograma de corrida eletroforética gerado por densitômetro. A curva A1 representa a albumina, A2 e alfa globulina; A3 a beta globulina e A4 gamaglobulina

Eletroforese

Princípio da técnica



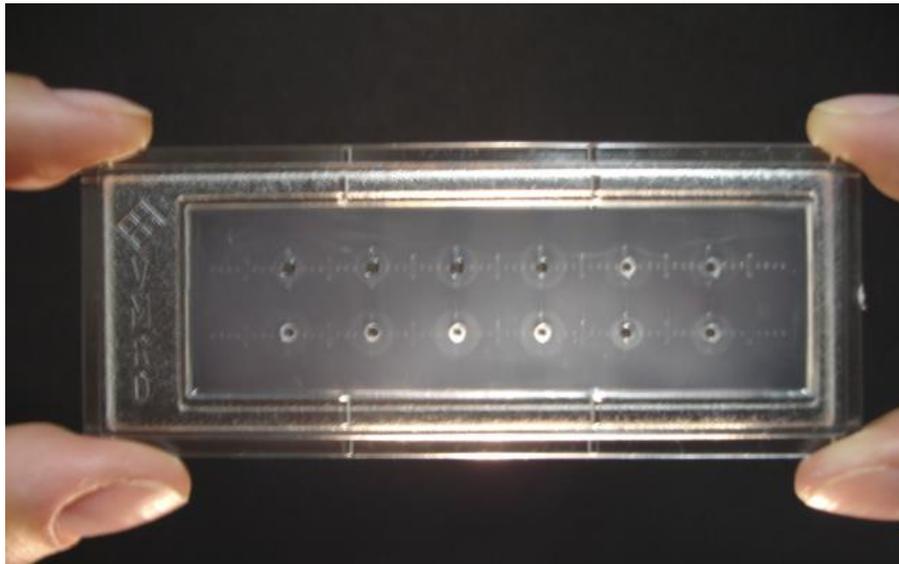
GeneEd

Determinação IgG

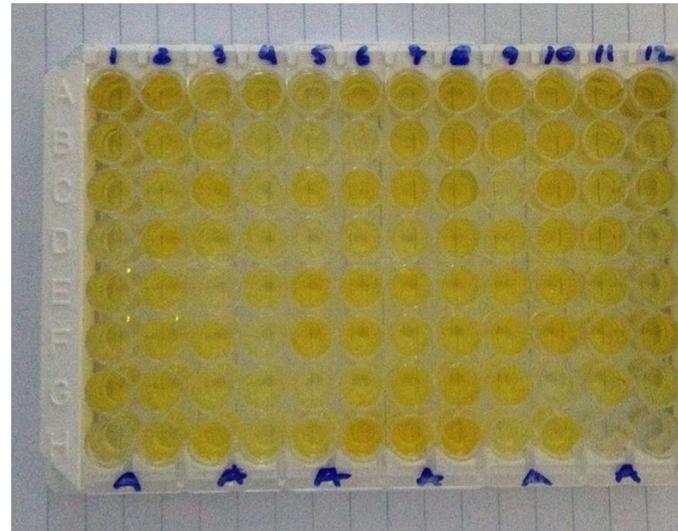


Teste Imunoenzimático (ELISA)

Custo, infra-estrutura laboratorial, mão obra, tempo entre execução e resultados



Imunodifusão radial



Teste imunoenzimático (ELISA)



Testes de triagem para detectar falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) em neonatos

Especificidade e sensibilidade não tão altas quanto o padrão-ouro (testes imunoenzimáticos e IDGA)

Vantagens: rápidos e até mesmo imediatos, simples, baratos e não exigem infraestrutura laboratorial

Correlação entre os testes e padrão-ouro
(IgG IDGA < 10g/L)

Proteína Sérica total

Ponto de corte 5,2g/dL

94,5% sensibilidade (falso-positivo)

66,7 especificidade

Ponto de corte 5,5 g/dL

76,3% sensibilidade

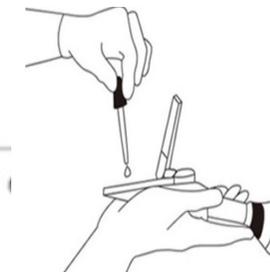
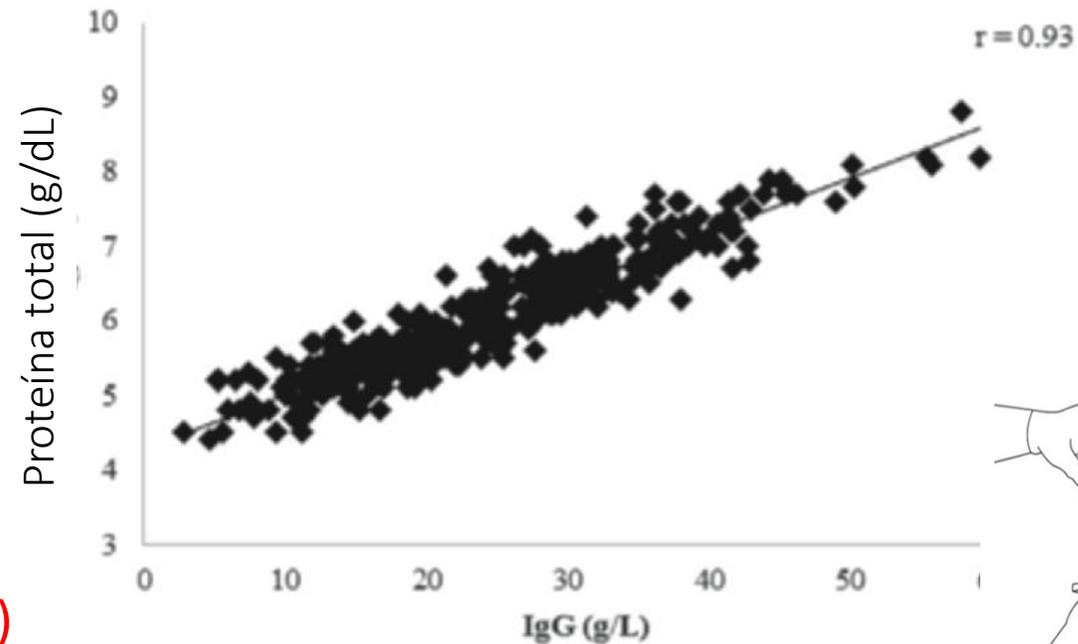
94,4% especificidade (falso-negativo)

Ponto de corte 5,7 g/dL

64,4% sensibilidade

100% especificidade

Deelen et al., JDS, 2014



antes e após ingerir colostro de até 2g/dL

Acurácia diagnóstica – habilidade de um teste distinguir entre pacientes doentes (Se) e sem a doença (Sp)

Determinação semi-quantitativa e qualitativas de Imunoglobulinas



Ensaio turbidométrico *Constable et al., 2017*

Kits comerciais não disponíveis BR

Reação precipitação seletiva do sal com proteínas de alto peso molecular

Teste de turbidez c/ sulfato de zinco 350 mg *Hudgens et al., American Journal Veterinary Research, 1996*

Baixa especificidade (falso positivo), não indicado amostras hemolisadas e o reagente deve ser mantido livre de CO₂

Teste de precipitação c/sulfato de sódio 14%, 16% e 18% *Constable et al., 2017*

Reação precipitação seletiva do sal com proteínas de alto peso molecular

Determinação grosseira da concentração de IgG

% alta de bezerros classificados erroneamente com FTIP

Teste de Coagulação do Glutaraldeído



Baseia-se no princípio de que a solução de glutaraldeído em baixas concentrações origina complexos insolúveis com Igs, resultando em coagulação da mistura (também forma complexos insolúveis com o fibrinogênio)

REAÇÃO POSITIVA

Coagulação firme (não se desloca quando o tubo é inclinado)

Teste de coagulação do glutaraldeído
(sol.glutaraldeído 10%)

Teor de Igs RUMINANTES	Reação de Coagulação (incubação de 1h)
< 400 mg/dL	-
400-600 mg/dL	Parcial
>600mg/dL	+

Teor de Igs EQUINOS	Reação de Coagulação (incubação de 1h)
>800mg/dL	Coagulação aos 10 minutos
400-800 mg/dL	Coagulação aos 60 minutos
< 400 mg/dL	Ausência de coagulação

Fibrinogênio



5% das proteínas plasmáticas

Maior concentração entre as PFAs

Refratometria

Mede-se a concentração de proteína plasmática antes e após a precipitação do fibrinogênio por aquecimento a 56°C por 10 minutos

leituras = teor de fibrinogênio

Método factível para detecção hiperfibrinogenemia

Hiperfibrinogenemia



Desidratação

#Aumento relativo e absoluto

PP:Fib > 15 = Desidratação

PP:Fib < 10 = Aumento real do fibrinogênio

$$\text{PP/Fib} = \frac{\text{PP (g/dL)}}{\text{Fib (mg/dL)}/.1000}$$

Exemplo 1:

Proteína total – 8.0g/dL

Fibrinogênio – 200 mg/dL

Exemplo 2:

Proteína total – 7.0 g/dL

Fibrinogênio – 800 mg/dL

Hiperfibrinogenemia



Desidratação

#Aumento relativo e absoluto

PP:Fib > 15 = Desidratação

PP:Fib < 10 = Aumento real do fibrinogênio

$$\text{PP/Fib} = \frac{\text{PP (g/dL)}}{\text{Fib (mg/dL)}/.1000}$$

Proteína de fase aguda Positiva

Redução – Coagulação Intravascular
Disseminada

Aumento- Processos Inflamatórios

Ruminantes é interpretada em associação com
o hemograma, elevação acentuada

Equinos, aumento discreto

Cães e gatos, aumento é inconsistente com
inflamação