



ASSOCIAZIONE ITALIANA  
DI PATOLOGIA VETERINARIA

**AIPVet**

**ASSOCIAZIONE ITALIANA DI PATOLOGIA VETERINARIA**

**ATTI VIII CONGRESSO NAZIONALE**

**ISSN 1825 - 2265**



**PADOVA**

**15-17 Giugno 2011**

**Premio Ennio Sanna 2011**

CLASSIFICAZIONE, EPIDEMIOLOGIA, PROGNOSI E PROFILI DI ESPRESSIONE PROTEICA DEL TUMORE MAMMARIO DEL CANE.

*Rasotto R., Goldschmidt M., Castagnaro M., Carnier P., Zappulli V.*

**Premio Rosario Preziosi 2011**

ESPRESSIONE DELLA B-CATENINA E DELLA SURVIVINA NEI TUMORI DEI NERVI PERIFERICI DEL CANE.

*Bongiovanni L., Romanucci M., Liberatori S., Oevermann A., Malatesta D., Della Salda L.*

**La successione delle presentazioni in questo volume degli Atti riflette, sia per le comunicazioni orali che per i poster, l'ordine di elencazione nel programma definitivo.**

## Relazioni a invito

### Gastrointestinal pathology:

- Endoscopic gastrointestinal biopsy and the WSAVA guidelines for the interpretation of gastrointestinal inflammation in the dog and cat.
- Inflammatory enteropathies of the dog and cat.

*Day Michael*

### Gastrointestinal pathology:

- Feline inflammatory bowel disease.
- Gastrointestinal tumor of the dog and cat.

*Day Michael*

## Comunicazioni

CARATTERIZZAZIONE DELL'INFEZIONE DA CMV NEL TRATTO INTESTINALE DI 49 PRIMATI XENOTRAPIANTATI.

*Cavicchioli L., Ferraresso S., Zanetti R., Barry P., Boldrin M., Baldan N., Ancona E., Cozzi E., Castagnaro M.*

LA LINFANGIECTASIA INTESTINALE SECONDARIA DEL CANE: CORRELAZIONI ANATOMO-CLINICHE E NUOVE EVIDENZE PATOGENETICHE.

*Rossi G., Magi G.E., Pengo G., Subeide M., Cammertoni N., Renzoni G., Allenspach K.*

POSSIBILE SIGNIFICATO PROGNOSTICO DELL'INFILTRATO INFIAMMATORIO NEI TUMORI COLORETTALI DEL CANE.

*Lepri E., Mechelli L., Vitellozzi G.*

ESPERIENZA PILOTA DI DIDATTICA A DISTANZA PER L'INSEGNAMENTO DELLA PATOLOGIA CLINICA.

*Comazzi S., Gelain M., Zufferli V.*

CORRELAZIONE ISTOLOGICA MAMMOGRAFICA ED ECOGRAFICA DI LESIONI PRECANCEROSE E NEOPLASTICHE MAMMARIE DEL CANE: ANALOGIE CON QUANTO RIPORTATO IN CAMPO UMANO.

*Mohammed Sulma I.<sup>1</sup>, Meloni G.B., Pinna Parpaglia M.L., Marras V., Burrai G.P., Meloni F., Polinas M., Pirino S., Antuofermo E.*

VALIDAZIONE DI TOPI REPORTER PER L'ESPRESSIONE DI TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND (TRAIL) ATTRAVERSO L'APPLICAZIONE COMBINATA DI TECNICHE IMMUNOISTOCHIMICHE ED IMAGING MOLECOLARE.

*Radaelli E., Castiglioni V., Maravigna L., Vantaggiato C., Maggi A., Scanziani E., Ciana P.*

CLASSIFICAZIONE, EPIDEMIOLOGIA, PROGNOSI E PROFILI DI ESPRESSIONE PROTEICA DEL TUMORE MAMMARIO DEL CANE.

*Rasotto R., Goldschmidt M., Castagnaro M., Carnier P., Zappulli V.*

IMMUNOLOCALIZZAZIONE DIFFERENZIALE DEL DOMINIO INTRACELLULARE DI NOTCH-1

NEI TUMORI MAMMARI DEL GATTO.

*Ressel L., Else W.R., Poli A., Argyle D. J.*

LA FOSFORILAZIONE DELL' $\alpha$ 1-GLICOPROTEINA ACIDA INFLUENZA L'ATTIVITÀ DI FAGOCITOSI E DI KILLING DEI NEUTROFILI E DEI MONOCITI.

*Lecchi C., Cavallini A., Martino P.A., Sartorelli P., Scarafoni A., Bronzo V., Cecilianì F.*

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE DEL PROGESTERONE TRAMITE QPCR ASSOLUTA NEI BOVINI.

*Uslenghi F., Divari S., Cannizzo F.T., Demaria R., Spada F., Mulasso C., Pezzolato M., Bozzetta E., Attucci A., Giorgi P., Biolatti B.*

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI SAA E HP IN TESSUTI DI BOVINI SANI DOPO IDENTIFICAZIONE DI GENI DI RIFERIMENTO.

*Dilda F., Lecchi C., Sartorelli P., Cecilianì F.*

INDAGINI ISTOLOGICHE E BIOMOLECOLARI PER IL CONTROLLO DELL'USO ILLEGALE DEL  $17\beta$  ESTRADIOLO NELLA SPECIE OVINA.

*Puleio R., Tamburello A., Schiavo M.R., Usticano A., Giardina P., Bozzetta E., Loria G.R., Carruba G., Miceli V.*

VALUTAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'INFETTIVITÀ NELLE GHIANDOLE SALIVARI E NELLA SALIVA DI OVINI AFETTI DA SCRAPIE.

*Vascellari M., Nonno R., Fragkiadaki E., Bigolaro M., Di Bari M.A., Marcon S., D'Agostino C., Vaccari G., Conte M., De Grossi L., Rosone F., Giordani F., Agrimi U., Mutinelli F.*

PATOLOGIA MALFORMATIVA NEL VITELLO: CONTRIBUTO CASISTICO.

*Binanti D., Prati I., Sironi G., Riccaboni P.*

VALUTAZIONI ISTOPATOLOGICHE SU LESIONI TUBERCOLOTICHE INDOTTE IN TOPI KNOCK-OUT PER IL GENE IRF-8.

*Rocca S., Anfossi A., Delogu G., Schiavoni G., Sali M., Palucci I., Abalsamo L., Mattei F., Sanchez M., Palma C., Leoni A., Fadda G., Belardelli F., Gabriele L.*

LINFOMA STADIO V: RELAZIONE TRA INFILTRAZIONE MIDOLLARE E CITOPENIE PERIFERICHE NEL CANE.

*Martini V., Gelain M.E., Comazzi S.*

VEGF E MMP-9 CROSS-TALK: POSSIBILI BIOMARCATORI NEL LINFOMA CANINO.

*Aricò A., Comazzi S., Gelain M.E., Riondato F., Martini V., Aresu L.*

MOLECOLE DI ADESIONE E METALLOPROTEASI: INDAGINE SUL RUOLO DI CD44s e MMP-9 NELLE NEOPLASIE EMATOPOIETICHE CANINE.

*Martini V., Aricò A., Aresu L., Giantin M., Riondato F., Comazzi S., Gelain M.E.*

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI HEAT SHOCK PROTEINS E PATHWAY MOLECOLARI CORRELATI NELL'OSTEOSARCOMA CANINO.

*Romanucci M., Bongiovanni L., D'Amato G., Malatesta D., Palmieri C., Buracco P., De Maria R., Della Salda L.*

RUOLO DEL PATHWAY PDGFRS/PDGFS NELL'OSTEOSARCOMA CANINO: STUDIO DI BERSAGLI MOLECOLARI PER STRATEGIE TERAPEUTICHE INNOVATIVE.

*Maniscalco L., Iussich S., Morello E., Martano M., Buracco P., Biolatti B., Della Salda L., Tirrito F., De Maria R.*

LA 17-AAG, UN POTENTE INIBITORE DELL'HSP90, INDUCE EFFETTI ANTIPROLIFERATIVI E PROAPOPTOTICI NELLA LINEA CELLULARE D22 DI OSTEOSARCOMA CANINO.

*Malatesta D., Palmieri C., Bongiovanni L., Romanucci M., Nori C., Buracco P., De Maria R., De Martinis M., Ginaldi L., Della Salda L.*

PARAMETRI PROGNOSTICI NEI TUMORI PERIVASCOLARI DEL CANE.

*Avallone G., Boracchi P., Stefanello D., Ferrari R., Roccabianca P.*

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLA CADERINA-E NELLE PATOLOGIE ISTIOCITARIE CUTANEE DEL CANE.

*Magi G.E., Piermartini M., Rossi G., Renzoni G.*

LESIONI GRANULOMATOSE SIMIL-TUMORALI CON ECCESSIVA MINERALIZZAZIONE IN STORIONI RUSSI (*Acipenser gueldenstaedtii*) AFFETTI DA MICOBATTERIOSI.

*Nuvoli S., Prearo M., Hetzel U., Burrai G.P., Giorgi I., Pedron C., Foddai G., Sanna M.A., Antuofermo E.*

VALORE PREDITTIVO DEGLI ESAMI CLINICO-LABORATORISTICI NELLA FIBROSI RENALE DEL CANE.

*Mezzalana G., Aresu L., Cavicchioli L., Drigo M., Caldin M., Castagnaro M.*

BIOPSIE RENALI SERIALI IN CANI CON LEISHMANIOSI: STUDIO CLINICO-PATOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO.

*Benali S., Brovida C., Cavicchioli L., Castagnaro M., Aresu L.*

SOTTOPOPOLAZIONI DI LINFOCITI T NELL'ENCEFALO DI CANI AFFETTI DA LEISHMANIOSI VISCERALE.

*Melo G.D., Schweigert A., Fernandes F.V., Seraguci T.F., Machado G.F.*

ESPRESSIONE DEI RECETTORI PER I CANNABINOIDI DI TIPO 1 E 2 NELLA CUTE DI CANE SANO E AFFETTO DA DERMATITE ATOPICA.

*Campora L., Miragliotta V., Ricci E., Cristino L., Di Marzo V., Albanese F., della Valle M.F., Abramo F.*

APPLICAZIONE DI LECTINE SU *SACCULUS ROTUNDUS* DI CONIGLI NATURALMENTE INFETTI PER UNO STUDIO SULLE CELLULE M.

*Poppi L., Luban G., Cristaudo I., Terreran A., Castagnaro M.*

## **Poster**

UN CASO DI LEYDIGOMA TESTICOLARE NEL GATTO.

*Asproni P., Millanta F., Bertolini E., Poli A.*

UN CASO DI SEMINOMA METASTATIZZANTE IN UN CONIGLIO DA COMPAGNIA.

*Banco B., Stefanello D., Giudice C., D'Acerno M., Cotti Cometti S., Di Giancamillo M., Grieco V.*

ESPRESSIONE DELLA B-CATENINA E DELLA SURVIVINA NEI TUMORI DEI NERVI PERIFERICI DEL CANE.

*Bongiovanni L., Romanucci M., Liberatori S., Oevermann A., Malatesta D., Della Salda L.*

EFFETTI DELLA STABULAZIONE SULL'ESPRESSIONE GENICA DELLE CITOCHINE NEI VITELLONI PIEMONTESI.

*Cannizzo F.T., Starvaggi Cucuzza L., Divari S., Bellino C., D'Angelo A., Biolatti B.*

FATTORI PROGNOSTICI DEI TUMORI PERIVASCOLARI CANINI: STUDIO PRELIMINARE SU 32 CASI.

*Carminato A., Vascellari M., Baioni E., Marchioro W., Capello K., Mutinelli F.*

ZIGOMICOSI SISTEMICA IN UNA *Macaca fascicularis* XENOTRAPIANTATA DI RENE.

*Cavicchioli L., Cozzi E., Castagnaro M.*

PROVE DI INFEZIONE SPERIMENTALE DI *Xenopus laevis* (Daudin,1802) CON RANAVIRUS: RISULTATI PRELIMINARI.

*Fioretto B., Bovo G., Poppi L., Quaglio F.*

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DI METALLOPROTEASI 9 (MMP9) NEL MELANOMA IRIDEO FELINO.

*Giudice C., Stornelli V., Grieco V.*

ENDOCARDIOSI NELLE VOLPI (*Vulpes vulpes*): STUDIO ANATOMO-ISTOPATOLOGICO.

*Guarda F., Scaglione F.E., Grande D., Carpignano M., Chiappino L., Ferroglio E., Bollo E.*

IL BUMBLEFOOT: OSSERVAZIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE IN RAPACI.

*Lanteri G., Meduri F., Ricotta V., Mazzullo G.*

FIBROSI POLMONARE MULTINODULARE EQUINA ASSOCIATA AD EHV-5: RILIEVI ISTOLOGICI ED INDAGINI BIOMOLECOLARI.

*Lepri E., Sforza M., Brachelente C., Marenzoni M.L., Passamonti F., Cappelli K., Vitellozzi G.*

*EPITHELIOGENESIS IMPERFECTA* IN UN AGNELLO DI RAZZA SARDA.

*Maestrale C., Masia M., Marruchella G., Di Guardo G., Mancosu A., Denti S., Macciocu S., Ligios C.*

LA LIPIDOMICA QUALE TECNICA DIAGNOSTICA INNOVATIVA PER LO STUDIO DELLE NEOPLASIE DEL TESSUTO ADIPOSO.

*Marino F., Chiofalo B., De Stefano C., Panebianco A., Macrì B.*

BESNOITIOSI BOVINA (*Besnoitia besnoiti*) IN ITALIA: QUADRI ANATOMO-CITO-ISTOPATOLOGICI ED ULTRAISTRUTTURALI.

*Militerno G., Bassi P., Mandrioli L., Morandi F., Gentile A.*

CARCINOMA INFIAMMATORIO MAMMARIO PRIMARIO IN UNA GATTA

*Millanta F., Asproni P., Verin R., Giannetti G., Lorenzi D., Poli A.*

ESPRESSIONE DI RECETTORI TIROSINCHINASICI NEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL GATTO.

*Morini M., Sabattini S., Bettini G.*

L'ESPRESSIONE DEI MARKERS DI AUTOFAGIA, BECLINA 1, LC3 E P62, NEI MUSCOLI DEI CANI ANZIANI.

*Pagano T.B., Costagliola A., De Biase D., Iovane V., Papparella S., Paciello O.*

MODIFICAZIONI ULTRASTRUTTURALI DEI MIOCARDIOCITI IN UN CASO DI RABDOMIOMA CARDIACO IN UN CINGHIALE (*Sus scrofa*).

*Palmieri C., Zappulli V., Caliari D., Della Salda L.*

STUDIO PRELIMINARE IMMUNOISTOCHEMICO ED ULTRASTRUTTURALE DEL CARCINOMA CUTANEO ANNESSIALE A CELLULE CHIARE DEL CANE

*Palmieri C., Zappulli V., Ferro S., Benali S., Della Salda L.*

RUOLO DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE E DELLA REAZIONE URANAFFINE NELLA DIAGNOSI DEI CHEMODECTOMI DEL CANE.

*Palmieri C., Pirocchi V., Della Salda L.*

PATOLOGIA E PATOLOGIA CLINICA NELL'AMBITO DI UN PROGETTO INTEGRATO DI GENOMICA APPLICATA ALLE PRODUZIONI E ALLA SANITÀ ANIMALE: IL PROGETTO PROZOO.

*Paltrinieri S., Giordano A., Moretti P., Binanti D., Sironi G., Scanziani E., Williams J.*

ASPETTI ANATOMOPATOLOGICI IN UN CASO DI LINFOMA A CELLULE T ASSOCIATO AD ENTERITE "COELIAC-LIKE" IN *Lemur catta*.

*Pascotto E., Volpatti D., Magnone W., Sandri C., Galeotti M.*

UN CASO DI GANGLIONITE LINFOPLASMACELLULARE DEI PLESSI MIOENTERICI ASSOCIATA AD INFEZIONE DA EHV-1 IN UN CAVALLO.

*Pavone S., Sforza M., Gialletti R., Prato S., Marenzoni M.L., Mandara M.T.*

ASPETTI ISTOPATOLOGICI, IMMUNOISTOCHEMICI E MOLECOLARI IN QUATTRO CASI DI LEISHMANIOSI FELINA.

*Puleio R., Tamburello A., Lupo T., Migliazzo A., Loria G.R., Pennisi M.G.*

CONCENTRAZIONE EMATICA DI MARKER INFIAMMATORI E DI OMOCISTEINA IN CANI CON PATOLOGIE GASTROENTERICHE SU BASE INFIAMMATORIA.

*Rossi G., Breda S., Giordano A., Pengo G., Dall'Ara P., Rossi G., Paltrinieri S.*

PENTALOGIA DI FALLOT IN UNA TIGRE SIBERIANA (*Panthera tigris altaica*) IN CATTIVITÀ

*Scaglione F.E., Tursi M., Chiappino L., Schröder C., Triberti O., Bollo E.*

SPLENITE GRANULOMATOSA DA *Cryptococcus neoformans* IN UN GATTO.

*Scarpa F., Galuppi R., Diana A., Michelon D., Ghiotto S., Bettini G.*

UN CASO DI PNST PREPUZIALE IN UN CAVALLO: STUDIO MORFOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO.

*Sfacteria A., Perillo L., Rifici C., Mazzullo G.*

CARATTERIZZAZIONE DI LESIONI GRANULOMATOSE IN UNA POPOLAZIONE DI CEFALI DEL MAR LIGURE ORIENTALE.

*Varello K., Prearo M., Serracca L., Giorgi I., Audino V., Righetti M., Pezzolato M., Ercolini C., Bozzetta E.*

## CARATTERIZZAZIONE DELL'INFEZIONE DA CMV NEL TRATTO INTESTINALE DI 49 PRIMATI XENOTRAPIANTATI

Cavicchioli Laura<sup>1</sup>, Ferrareso Serena<sup>1</sup>, Zanetti Rossella<sup>1</sup>, Barry Peter<sup>2</sup>, Boldrin Massimo<sup>3</sup>, Baldan Nicola<sup>4</sup>, Ancona Ermanno<sup>3,4</sup>, Cozzi Emanuele<sup>3,5</sup>, Castagnaro Massimo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova. <sup>2</sup>Center for Comparative Medicine, University of California-Davis, Davis, CA 95616, USA. <sup>3</sup>CORIT (Consorzio per la Ricerca sul Trapianto d'Organi), Padova.

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche, Università di Padova.

<sup>5</sup>Direzione Sanitaria, Ospedale di Padova

Infezioni generalizzate da citomegalovirus (CMV) sono state descritte in *Macaca fascicularis* immunosopresse. Lo scopo del lavoro è di indagare, attraverso approcci diagnostici diversi, la presenza d'infezione da CMV in 49 primati riceventi uno xenotrapianto di rene da suino.

In questo studio sono stati utilizzati 52 primati: 49 riceventi uno xenotrapianto di rene e 3 parte di un trial di farmacocinetica. Tutti i primati, ospitati nello stesso stabulario, hanno ricevuto farmaci immunosoppressivi.

Considerata l'elevata omologia tra CMV di *Rhesus* e *Macaca fascicularis*, i primati sono stati sottoposti a esame sierologico ELISA per rhCMV, all'ingresso in stabulario (22 primati positivi, 20 negativi e 10 dubbi). Il test ELISA, ripetuto sui primati negativi o dubbi al momento del trapianto, ha evidenziato che tutti i primati avevano sierconvertito.

Al microscopio ottico sono state analizzate 320 sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, provenienti da segmenti del tratto gastrointestinale: 5 dei 52 primati hanno evidenziato lesioni compatibili con infezioni da CMV. Tutte le sezioni sono state sottoposte ad esame immunoistochimico (IHC) per l'espressione dell'antigene RhCMV IE1: 8 primati erano positivi e pertanto 3 primati non hanno mostrato segni istologici di infezione da CMV.

Una PCR specifica per il gene della DNA polimerasi (DPOL) eseguita su tessuto polmonare congelato, proveniente da un soggetto con intensa positività IHC ha evidenziato un'identità di sequenza del 99% tra CMV di *Rhesus* e *Macaca fascicularis* (identità del 100% a livello aminoacidico).

L'esame IHC, rispetto a quello istologico, ha dimostrato specificità e sensibilità maggiori nell'evidenziare infezione da CMV nei primati immunosoppressi e xenotrapiantati. La presenza di lesioni correlate all'infezione da CMV negli animali xenotrapiantati renderebbe auspicabile una profilassi anti-CMV in questo modello.

**Parole chiave:** CMV, intestino, primate, xenotrapianto.

### DETECTION OF CMV-RELATED GASTROINTESTINAL TRACT INFECTIONS IN A SERIES OF 49 XENOTRANSPLANTED PRIMATES

Generalized CMV infections have been observed in immunosuppressed cynomolgus monkeys. Therefore, in this study we have investigated, using different approaches, the presence of CMV infection in a series of 49 primate recipients of porcine renal xenografts.

Fifty-two *Macaca fascicularis* were used: 49 were recipients of kidney xenografts and 3 were part of a pharmacokinetic trial. All primates were housed in the same facility and treated with immunosuppressive drugs.

As a high level of homology between *Rhesus* and *Macaca fascicularis* CMV has previously been reported, primates were tested serologically by ELISA for rhCMV upon arrival at the facility (22 positive, 20 negative and 10 equivocal). The serological test repeated on the negative and doubtful animals at the time of transplantation showed that all primates had serum-converted.

Three-hundred and twenty formalin-fixed paraffin-embedded sections of gastrointestinal (GI) tract were analyzed by light microscopy: 5 of the 52 primates showed lesions associated with CMV infection. All sections were also studied by immunohistochemistry (IHC) for expression of RhCMV IE1 antigen: 8 primates were IHC positive for CMV although 3 did not show any histological evidences of CMV infection.

A consensus-PCR with specificity for the herpesviral DNA-directed DNA polymerase gene (DPOL) was performed on a cryopreserved lung tissue of an IHC strongly positive primate and revealed a 99% identity of the DPOL gene between *Rhesus* and *Macaca fascicularis* CMV (100% identity at amino acid level).

IHC is more sensitive and specific in the detection of CMV infection in immunosuppressed, xenotransplanted primates than classical histology. In the light of the frequent observation of CMV-related lesions in xenotransplanted animals, an effective anti-CMV prophylaxis appears to be indispensable in such model.

**Key words:** CMV, intestinal tract, xenotransplantation.

## **LA LINFANGIECTASIA INTESTINALE SECONDARIA DEL CANE: CORRELAZIONI ANATOMO-CLINICHE E NUOVE EVIDENZE PATOGENETICHE**

**Rossi Giacomo, Magi Gian Enrico, Pengo Graziano, Subeide Mari, Cammertoni  
Natalina, Renzoni Giacomo, Allenspach Karin\***

*Scuola di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Camerino. \*Royal Veterinary College,  
University of London*

Sono stati analizzati 150 cani selezionati in modo random da una popolazione di 1103 cani sintomatici, esaminati in un periodo di 5 anni, nei quali era stata emessa diagnosi istologica di enterite linfoplasmacellulare. 134 cani asintomatici, endoscopizzati in corso di altre procedure chirurgiche sono stati usati come gruppo controllo. Si sono effettuate 10 biopsie dalla prima porzione dell'intestino tenue per cane, processate routinariamente per la microscopia ottica ed elettronica. Di tutti i cani arruolati era noto il valore di albuminemia. Per ogni campione l'esame istologico comprendeva la valutazione dello score infiammatorio (score 0-3) e la valutazione dell'altezza e della larghezza e del rapporto altezza/larghezza di almeno 10 villi ben campionati/per biopsia e del relativo vaso chilifero. Le medie dei valori ottenuti per biopsia sia del gruppo patologico che del gruppo di controllo, sono state comparate utilizzando il test T di Student. E' stata osservata una buona correlazione tra grado di infiltrazione infiammatoria e la dilatazione dei linfatici ed una correlazione positiva ( $p < 0.005$ ) tra diametro dei chiliferi maggiore  $45.3\mu\text{m}$  ed una ipoalbuminemia da lieve a moderata. Infine, ventisette biopsie di cani sani, coltivate con tre dosi differenti di TNF- $\alpha$  ricombinante umano e bloccate a 5, 12 e 48 ore di incubazione hanno dimostrato a livello endoteliale un incremento delle proteine associate ai complessi giunzionali ed una chiusura delle giunzioni serrate, indicando un possibile ruolo di TNF- $\alpha$  nella patogenesi della linfangiectasia secondaria.

**Parole chiave:** cane, linfangiectasia intestinale secondaria, ipoalbuminemia, TNF- $\alpha$ , immunoistochimica.

### **CANINE INTESTINAL SECONDARY LYMPHANGIECTASIA: ANATOMO- CLINICAL CORRELATIONS AND NEWS PATHOGENETICAL INSIGHTS**

We studied 150 randomly selected dogs in which the diagnosis of lymphoplasmacytic enteritis had been established, belonging to a population of 1103 symptomatic dogs, examined in a period of five years. A group of 134 dogs without any gastrointestinal signs were analyzed endoscopically during other surgical procedures and histologic samples were collected as controls. Albuminemia values were obtained from all dogs included in the study. Ten bioptic samples per dog were taken from the proximal portion of the small intestinal mucosa and routinely processed for histological and ultrastructural examination. The histological examination of H&E-stained sections included the assessment of the number of inflammatory cells (score 0 – 3) evaluated in each biopsy. Villous assessment comprehended height, width and the h/w average evaluation for the villi and related villous chiliferous lymphatic vessels. A good correlation was observed between degree of mucosal infiltration and lymphatic dilation and a correlation ( $p < 0.005$ ) was also observed between a diameter larger than  $45.3\mu\text{m}$  of chiliferous vessel and a mild to moderate loss of serological levels of albumin. Finally, 27 healthy intestinal biopsies were cultivated for 48h with human-recombinant TNF- $\alpha$  added to medium (concentration of 0.5; 1, and 10% v/v), and samples were fixed at 5, 12, and 48hrs after TNF- $\alpha$  addition, then embedded for histological and ultrastructural examination. Increased levels of TJ associated-proteins (Occludin and Zo-1), and a closure of the TJs was observed by TEM after TNF- $\alpha$  incubation, suggesting a role of TNF- $\alpha$  in canine secondary intestinal lymphangiectasia pathogenesis.

**Key words:** dog, secondary intestinal lymphangiectasia, hypoalbuminaemia, TNF- $\alpha$ , immunohistochemistry.

## **POSSIBILE SIGNIFICATO PROGNOSTICO DELL'INFILTRATO INFIAMMATORIO NEI TUMORI COLORETTALI DEL CANE**

**Lepri Elvio, Mechelli Luca, Vitellozzi Giovanni**

*Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari,  
Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia*

I tumori coloretali sono relativamente comuni nel cane; sebbene nella maggior parte dei casi tali tumori abbiano andamento benigno, a volte possono progredire a carcinoma invasivo. Nell'uomo è nota la progressione delle neoplasie coloretali da iperplasia-displasia, ad adenoma, carcinoma in situ ed invasivo; tra i parametri istomorfologici utilizzati per prevedere tale progressione sono entità dell'infiltrazione leucocitaria totale e delle singole tipologie di cellule infiammatorie; in particolare la presenza di eosinofili e mastociti sembra avere significato prognostico. Scopo del lavoro è una indagine retrospettiva sui tumori coloretali del cane per valutare presenza, entità e tipologia dell'infiltrato leucocitario, e correlarlo all'evoluzione della malattia.

Sono stati rivalutate 26 neoformazioni provenienti da colon e retto; la maggior parte dei campioni era rappresentato biopsie escissionali di lesioni polipoidi asportate tramite polipectomia (20/26); in 5 casi i campioni erano rappresentati biopsie incisionali prelevate per via endoscopica, ed in un solo caso da una sezione transmurale prelevata tramite celiotomia. Una lesione è stata classificata come polipo, 8 come adenoma e 17 come adenocarcinomi (in situ/invasivi). L'infiltrato infiammatorio è risultato intenso in 11 casi, moderato in 9 casi, lieve in 5 casi e assente in 1 caso. La tipologia di leucociti presenti andava da una prevalenza di granulociti eosinofili (8 casi) o di linfociti/plasmacellule (11 casi), con infiltrato infiammatorio misto (linfociti, plasmacellule, granulociti neutrofili ed eosinofili) nei restanti 6 casi. Erano disponibili dati sull'evoluzione della malattia in 17 casi; tra questi la prognosi è risultata favorevole in 12 casi (no recidiva/progressione ad un anno), mentre in 5 casi ha presentato un andamento sfavorevole (recidiva locale, infiltrazione profonda, metastasi). I dati raccolti non consentono una adeguata valutazione del significato prognostico che l'infiltrazione leucocitaria, in particolare eosinofila, potrebbe avere nella storia naturale dei tumori anorettali del cane; tuttavia il comune riscontro di un intenso infiltrato leucocitario, ed eosinofilo in particolare, pone interrogativi sul possibile significato che queste cellule potrebbero avere sia nell'insorgenza che nell'evoluzione delle lesioni epiteliali proliferative intestinali del cane.

**Parole chiave:** cane, tumori coloretali, infiammazione, eosinofili.

### **POSSIBILE PROGNOSTIC VALUE OF INFLAMMATORY INFILTRATE IN CANINE COLORECTAL TUMOR**

Aim of the study is to evaluate inflammatory infiltrate in canine colorectal tumors, with the goal to correlate it with biological behavior. 26 colorectal lesions (20 excisional, 5 incisional and 1 transmural biopsies) were retrospectively re-evaluated. 1 of the lesions was a polyp, 8 were adenomas and 17 adenocarcinomas; tumor associated inflammation was severe in 11 cases, moderate in 9, slight in 5 and absent in one case; infiltrate was mainly eosinophilic in 8 cases, lymphoplasmacytic in 11 cases and mixed in 6 cases. Follow-up data were available for 17 cases; in 12 of these cases the prognosis was good while in 5 cases there was local recurrence and/tumor progression (invasion-metastasis). The data from this retrospective study are not adequate to assess the significance of inflammatory infiltrate in canine colorectal tumors; nevertheless the inflammatory cells, especially eosinophils, may have a pathogenetic role in the natural history of canine colorectal tumors.

**Key words:** dog, colorectal tumors, inflammation; eosinophils.

## ESPERIENZA PILOTA DI DIDATTICA A DISTANZA PER L'INSEGNAMENTO DELLA PATOLOGIA CLINICA

Comazzi Stefano<sup>1</sup>, Gelain Maria Elena<sup>1</sup>, Zufferli Valentina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DIPAV Università degli Studi di Milano. <sup>2</sup>DIAL Università degli Studi di Udine

L'Università di Udine, nell'ambito della Facoltà di Medicina Veterinaria, fin dal 2003 per gli insegnamenti dell'area di Fisiologia Veterinaria e prima ancora per alcune attività integrative (progetto coordinato dal Prof. Alberto Prandi), ha sperimentato con successo l'utilizzo di una piattaforma per la didattica online in ambiti in cui l'attività laboratoristica risulta essenziale. Si tratta di un'iniziativa in continuo divenire che si arricchisce di anno in anno di esperienze che ne migliorano l'efficacia. Il corso integrato di Tecniche Diagnostiche Laboratoristiche (CdL Igiene e Sanità Animale) è stato considerato un buon candidato per sperimentare un sistema misto di diagnostica a distanza ed esercitazioni pratiche in laboratorio. La piattaforma è stata adattata per rendere disponibile settimanalmente lezioni teoriche seguite ogni 3 settimane da esercitazioni tenute in laboratorio ed al microscopio sugli argomenti svolti. La pubblicazione delle lezioni è seguita dall'invio del materiale in formato PDF ai singoli studenti, che svolge anche la funzione di materiale di studio, tramite mailing-list o forum di discussione. Gli studenti possono accedere liberamente alla piattaforma dove, ad ogni diapositiva, è legato un file audio contenente le spiegazioni del docente. L'accesso del singolo studente è monitorato dal docente tramite il sistema, così come quello al forum di discussione dove gli studenti possono richiedere spiegazioni aggiuntive. Accanto alle diapositive ed ai files audio la piattaforma permette di creare link diretti con filmati disponibili in rete o inseriti dal docente.

L'utilizzo di un sistema integrato di didattica a distanza e di esercitazioni pratiche permette da un lato di limitare la presenza fisica del docente alle sole sessioni esercitative consentendo allo studente di organizzarsi il tempo per la preparazione teorica, e dall'altro di utilizzare in modo produttivo i supporti multimediali che la rete mette a disposizione. Questo progetto pilota evidenzia l'utilità di ricorrere a nuove tecniche multimediali che possono permettere di mantenere elevato lo standard di offerta didattica a fronte delle effettive difficoltà di budget esistenti.

**Parole chiave:** didattica a distanza, patologia clinica, medicina di laboratorio.

### PILOT EXPERIENCE OF DISTANCE E-LEARNING FOR CLINICAL PATHOLOGY

We experimented the use of a platform dedicated to e-learning, developed by University of Udine, in teaching Veterinary Clinical Pathology to students in Animal Science. The course has been structured as follows: one or more theoretical lectures were put in the platform weekly followed by practice/microscopic sessions in laboratory every 3 weeks on the same arguments. PDF files were sent by forum chat or e-mail to the students and worked as material for personal study. The students are invited to access the platform in which each slide is linked to an audio file containing the explanation by the teacher. A discussion forum as well as an access-log is useful to better clarify any doubts and to monitor access by the teacher. In addition, the lectures can be directly linked to video files even found in the network.

An integrated system of distance e-learning and practice session allowed to limit the presence of the teacher only to practice and gave the opportunity to the students to personally plan the lectures and to take advantages from multimediality. This pilot project stresses the usefulness of experimenting new didactic systems in order to assure high didactic levels and to capitalize the opportunity of multimediality in teaching veterinary clinical pathology.

**Key words:** e-learning, clinical pathology, laboratory medicine.

# **CORRELAZIONE ISTOLOGICA MAMMOGRAFICA ED ECOGRAFICA DI LESIONI PRECANCEROSE E NEOPLASTICHE MAMMARIE DEL CANE: ANALOGIE CON QUANTO RIPORTATO IN CAMPO UMANO**

**Mohammed Sulma I.<sup>1</sup>, Meloni Giovanni B.<sup>2</sup>, Pinna Parpaglia Maria L.<sup>3</sup>, Marras Vincenzo<sup>4</sup>, Burrai Giovanni P.<sup>3\*</sup>, Meloni Francesco<sup>2</sup>, Polinas Marta<sup>3</sup>, Pirino Salvatore<sup>3</sup>, Antuofermo Elisabetta<sup>3§</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Comparative Pathobiology and Purdue Cancer Center for Research, Purdue University, USA.* <sup>2</sup>*Institute of Radiology, Sassari University School of Medicine, Italy.* <sup>3</sup>*Department of Pathology and Veterinary Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Sassari University, Italy.* <sup>4</sup>*Institute of Anatomy and Histopathology, Sassari University School of Medicine, Italy*

Lo studio dei meccanismi che determinano lo sviluppo di neoplasie invasive a partire da lesioni proliferative mammarie, quali l'iperplasia atipica (ADH) e il carcinoma in situ (CIS), è considerato uno step cruciale per lo sviluppo di nuovi sistemi terapeutici atti a prevenire il cancro al seno nella donna. L'utilizzo della mammografia e di altre metodiche di imaging ha consentito di diagnosticare precocemente tali lesioni. In precedenti lavori, abbiamo dimostrato come il cane manifesti lesioni mammarie precancerose simili a quelle della donna nella morfologia e nel fenotipo. In questo lavoro, condotto ex vivo, il nostro obiettivo è stato quello di osservare possibili similitudini tra immagini mammografiche ed ecografiche nelle due specie. Le indagini sono state eseguite su 40 cagne di età adulta, che presentavano sia neoplasie mammarie che lesioni precancerose. Le immagini ottenute sono state classificate in 5 categorie, secondo il sistema Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS) utilizzato in medicina umana, e correlate poi, con i risultati istopatologici. Macro e micro calcificazioni sono state osservate in associazione alla presenza di neoplasie mammarie e lesioni precancerose nel cane. La classificazione BI-RADS ha mostrato una sensibilità ed una specificità rispettivamente del 94% e dell'82,8%. La presenza di microcalcificazioni associate a lesioni precancerose osservate alla mammografia e l'elevata sensibilità del sistema BI-RADS confermano ulteriormente il valore di questo modello animale nello studio della patologia neoplastica mammaria nella donna.

**Parole chiave:** modello canino, microcalcificazioni, lesioni mammarie precancerose.

## **MAMMOGRAPHIC, SONOGRAPHIC AND HISTOPATHOLOGIC CORRELATION OF PRECANCEROUS LESIONS AND CANINE MAMMARY TUMORS: SIMILARITIES TO HUMAN BREAST CANCER**

Understanding the evolution of proliferative breast disease such as atypical hyperplasia (ADH) and carcinoma in situ (CIS) is essential for clinical management of women diagnosed with these lesions. Previously, we studied canine spontaneous ADH and DCIS and reported their similarities to human lesions in histopathological and molecular features as well as prevalence. To further validate the resemblance of these lesions to humans, we examined their mammographic and sonographic characteristics in comparison to those of human's as well as the potential of the human Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS) to predict canine disease. Non lesional, benign and malignant mammary glands of forty dogs were imaged using mammography and ultrasound. The images were then analyzed and statistically correlated with histopathological findings and to their similarities to humans. Our results showed that canine mammary preinvasive lesions, benign, and malignant tumors have mammographic abnormalities, including the presence, pattern and distribution of macro-calcification and micro-calcifications, similar to their humans' counterparts. BI-RADS categorization is an accurate predictor of mammary malignancy in canine with 94% of sensitivity and 82.8% of specificity. The mammographic images similarities and the ability of BI-RADS to predict canine mammary malignancies with high accuracy and sensitivity further confirm and strengthen the value of the dog as model to study human breast pre-malignancies for development of prognostic biomarkers.

**Key words:** canine animal model, microcalcification, precancerous mammary lesions.

**VALIDAZIONE DI TOPI REPORTER PER L'ESPRESSIONE DI TUMOR  
NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND (TRAIL)  
ATTRAVERSO L'APPLICAZIONE COMBINATA DI TECNICHE  
IMMUNOISTOCHEMICHE ED IMAGING MOLECOLARE**

**Radaelli Enrico<sup>1,2</sup>, Castiglioni Vittoria<sup>1,2</sup>, Maravigna Luca<sup>3</sup>, Vantaggiato Cristina<sup>3</sup>,  
Maggi Adriana<sup>3</sup>, Scanziani Eugenio<sup>1,2</sup>, Ciana Paolo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Mouse & Animal Pathology Lab, Fondazione Filarete, Milan.* <sup>2</sup>*DIPAV, School of Veterinary Medicine, University of Milan, Milan.* <sup>3</sup>*Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, Department of Pharmacological Sciences, University of Milan, Milan*

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) rappresenta uno dei più studiati oncosoppressori per la capacità di indurre apoptosi selettiva a carico di cellule tumorali. TRAIL è principalmente espresso a livello leucocitario dove svolge un ruolo primario nell'immunità antitumorale e nella regolazione della risposta immunitaria verso autoantigeni. La diffusa espressione di TRAIL in numerosi tessuti suggerirebbe inoltre come tale molecola svolga un ruolo primario nella regolazione di complessi e non ancora del tutto noti meccanismi biologici/patologici.

In questo studio, viene riportata la validazione di un modello murino transgenico in cui l'espressione dei geni reporter Luciferase (Luc) e Green Fluorescent Protein (GFP) risulta essere sotto il controllo trascrizionale di TRAIL. Come ampiamente dimostrato tramite metodiche di *in vivo/ex vivo* imaging molecolare, studi immunohistochimici e real time PCR, i profili espressivi di Luc, GFP e TRAIL sono sovrapponibili. Co-espressione di TRAIL e dei geni reporter è stata dimostrata a livello di epitelio della mucosa duodenale, pancreas endocrino, epitelio bronchiale e popolazioni istiocitarie a livello linfonodale e timico. L'espressione di TRAIL è stata inoltre indagata in corso di carcinogenesi mammaria DMBA-indotta. In tale contesto, un sensibile aumento di espressione di TRAIL è stato osservato a carico dell'epitelio tumorale.

Nel complesso, i dati emersi da tale studio dimostrano come tali topi reporter per l'espressione di TRAIL rappresentino un valido modello per lo studio del ruolo di TRAIL in diverse condizioni fisiologiche e patologiche.

**Parole chiave:** green fluorescent protein, luciferase, topi reporter, TRAIL.

**COMBINED BIOLUMINESCENCE MOLECULAR IMAGING AND  
IMMUNOHISTOCHEMICAL VALIDATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR-  
RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND (TRAIL) REPORTER MICE**

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) has emerged as one of the most important anti-tumor molecule because of its remarkable ability to induce apoptosis in transformed cells while leaving normal cells unaffected. TRAIL is mainly expressed on effector leukocytes participating in tumor surveillance and modulation of the immune response against self antigens. Furthermore, the consistent expression of TRAIL in a wide range of normal and diseased tissues suggests that it may be implicated in a series of undiscovered activities other than apoptosis of tumor cells and regulation of the immune response.

To investigate more in detail the diverse biological functions of TRAIL, we have developed a transgenic mouse model in which the reporter genes Luciferase (Luc) and Green Fluorescent Protein (GFP) are under the transcriptional control of TRAIL regulatory sequences. In this model, the expression pattern of Luc and GFP closely mirrors that of TRAIL gene, as extensively proven by *in vivo/ex vivo* imaging, immunohistochemistry and real time PCR experiments. Co-expression of TRAIL and reporter genes was demonstrated in duodenal epithelium, endocrine pancreas, bronchial epithelium and histiocytes populating thymus and lymph nodes. The expression of TRAIL during cancer progression was further investigated in a model of DMBA-induced mammary carcinogenesis. Compared to normal or hyperplastic mammary gland, an increased TRAIL expression was observed in the fully transformed mammary epithelium.

Collectively, our data validate a novel TRAIL reporter mouse that unquestionably represents a powerful and reliable experimental tool to dissect the role of TRAIL in diverse biological and pathological settings.

**Key words:** green fluorescent protein, luciferase, reporter mice, TRAIL.

## CLASSIFICAZIONE, EPIDEMIOLOGIA, PROGnosi E PROFILI DI ESPRESSIONE PROTEICA DEL TUMORE MAMMARIO DEL CANE

Rasotto Roberta\*, Goldschmidt Michael†, Castagnaro Massimo\*, Carnier Paolo‡, Zappulli Valentina\*

*\*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD). †Laboratory of Pathology and Toxicology, Department of Pathobiology, University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine, Philadelphia, PA 19104, USA. ‡Dipartimento di Scienze animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD).*

Il tumore mammario è la neoplasia più frequente nei cani femmina. I dati relativi all'eziopatogenesi, all'epidemiologia e al comportamento biologico di questa forma tumorale sono ancora in parte incompleti e controversi. È risaputo inoltre che tale forma tumorale è caratterizzata da un'elevata eterogeneità morfologica e la mancanza di precisi e definiti criteri diagnostici istopatologici rende spesso difficile un'adeguata standardizzazione nella formulazione della diagnosi. Da queste considerazioni è nata l'esigenza di approfondire alcuni aspetti classificativi nell'ambito di una collaborazione internazionale che ha portato alla definizione di criteri precisi per la distinzione tra forme neoplastiche benigne e maligne e alla stesura di una nuova classificazione per le lesioni iperplastiche/neoplastiche della mammella del cane. Tale classificazione si ispira al precedente sistema classificativo internazionale (WHO), ma risulta rielaborata e integrata con alcune nuove entità morfologiche. Applicando questi criteri e la nuova classificazione su 2143 campioni di tessuto mammario canino e mettendo i risultati ottenuti in relazione ad altre specifiche valutazioni morfologiche e a dati segnaletici e di *follow-up* è stato possibile mettere in risalto alcuni aspetti, in parte noti e in parte nuovi, relativi all'epidemiologia e al comportamento biologico di questa forma tumorale. E' stata dimostrata o in altri casi confermata e dettagliata, la valenza prognostica di alcuni parametri quali il diametro tumorale, l'invasione del sistema linfatico, il grado istologico di malignità, l'infiltrazione periferica e la presenza di pattern micropapillare. Per molte delle tipologie tumorali descritte è stato riconosciuto un comportamento biologico specifico. Mediante indagine immunohistochimica per marcatori di differenziazione e proliferazione cellulare è stato approfondito lo studio di una nuova tipologia tumorale (carcinoma e mioepitelioma maligno) caratterizzata dalla presenza di cellule mioepiteliali maligne.

**Parole chiave:** tumore mammario, cane, classificazione, epidemiologia, prognosi.

## CLASSIFICATION, EPIDEMIOLOGY, PROGNOSIS AND PROTEIN EXPRESSION PROFILES OF CANINE MAMMARY TUMOURS

Mammary tumors are the most common neoplasms in female dogs. Available data regarding etiopathogenesis, epidemiology and biological behavior of this tumor type are still incomplete and controversial. It is widely known these tumors are highly heterogeneous in morphology and that the lack of precise histopathological diagnostic criteria does not allow an adequate standardization of the diagnosis. Based on these considerations, and as a part of an international collaboration, we studied in details some aspects regarding the classification of these neoplasms. This allowed us to define precise criteria for the distinction between benign and malignant mammary tumors and to write a new WHO-modified classification for the hyperplastic/dysplastic and neoplastic lesions of canine mammary gland. These standardized criteria were applied on 2143 samples of canine mammary tissue. Relations between all the results obtained, signalment, and *follow-up* data were investigated to improve the knowledge about epidemiology and biological behavior of canine mammary tumors. The prognostic value of different histopathological parameters was discussed in details. For many tumors subtypes a specific biological behavior was recognized. Of particular interest was the immunohistochemical study of a new tumor subtype (carcinoma and malignant myoepithelioma) characterized by the presence of malignant myoepithelial cells.

**Keywords:** mammary tumor, dog, classification, epidemiology, prognosis.

## **IMMUNOLOCALIZZAZIONE DIFFERENZIALE DEL DOMINIO INTRACELLULARE DI NOTCH-I NEI TUMORI MAMMARI DEL GATTO**

**Ressel Lorenzo\*, Else W. Roderick\*\*, Poli Alessandro\*, Argyle David J.\*\*\***

*\*Dipartimento di Patologia Animale, profilassi e igiene degli alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa. \*\*Department of Pathology, Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh. \*\*\*Hospital for Small Animals, Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh*

NOTCH-1 è un recettore cellulare trans-membrana I cui ligandi sono espressi sulla superficie di cellule limitrofe (sistema di signaling Juxtacrino). Il legame fra ligando e recettore determina un clivaggio proteolitico della porzione intracellulare di NOTCH-I chiamata NICD la quale trasloca all'interno del nucleo e altera l'espressione genica della cellula bersaglio. Si descrive l'immunolocalizzazione di NICD nei tumori mammari del gatto. Quarantadue lesioni neoplastiche (36 maligne, 6 benigne) sono state immuno-marcate con un anticorpo monoclonale specifico per NICD felina e l'espressione immunohistochimica della proteina è stata valutata mediante sistema semiquantitativo e quantitativo basato su analisi di immagine. I risultati dell'espressione di NICD sono stati associati ai normali parametri morfologici di malignità. Dei 36 soggetti con lesioni neoplastiche maligne 26 sono stati oggetto di follow-up di 2 anni e si è indagata l'associazione fra l'espressione della proteina e l'overall survival (OS). L'espressione di NICD è stata osservata nel nucleo o nel citoplasma delle cellule. La positività nucleare è risultata associata alle lesioni benigne, mentre la localizzazione citoplasmatica si è osservata nelle lesioni neoplastiche maligne. Nei tumori mammari maligni non è stata riscontrata associazione fra l'immuno-espressione di NICD e i parametri morfologici o l'OS. La localizzazione sub-cellulare di NICD appare differente nei fenomeni neoplastici maligni e nelle lesioni benigne a carico della mammella del gatto. L'immunolocalizzazione nucleare è compatibile con la classica pathway metabolica di NOTCH-I, mentre l'espressione citoplasmatica della proteina suggerisce una sua attivazione aberrante con coinvolgimento di differenti vie metaboliche associate alla trasformazione in senso neoplastico maligno.

**Parole chiave:** NOTCH-I, NICD, tumori mammari del gatto.

## **DIFFERENTIAL SUB-CELLULAR IMMUNO-LOCALIZATION OF NOTCH-I ACTIVATED INTRACELLULAR DOMAIN (NICD) IN FELINE MAMMARY TUMOUR**

NOTCH-I is a trans-membrane receptor. Ligand proteins expressed on the surface of neighbor cells bind to the NOTCH-I extracellular domain by Juxtacrine signaling and induce proteolytic cleavage by Gamma-secretase and subsequent release of the intracellular domain (NICD). NICD enters the cell nucleus to alter gene expression. We describe immunohistochemical expression of NICD and correlation to clinico-pathological parameters in feline mammary tumours (FMT). Forty-two FMT (36 malignant, 6 benign) were submitted to a semi-quantitative and digital image based Immunohistochemical analysis of NICD using an anti-feline NICD monoclonal antibody. Association with NICD expression and morphologic parameters was investigated. Of the 36 malignant lesions, 26 were submitted to a two-year follow-up. The NICD expression in malignant lesions was correlated to the overall survival (OS). NICD expression was detected in the nucleus or in the cytoplasm of FMT. Nuclear expression was associated with benign lesions, while cytoplasmic localization was associated with malignant lesions. In malignant FMT the majority of tumours expressed NICD in the cytoplasm and there was not a significant correlation between positive or negative IHC NICD expression and OS. NOTCH immuno-localization was different in benign and malignant FMT. Nuclear localization is consistent with traditional NICD metabolic intra nuclear pathway while cytoplasmic accumulation is characteristic of aberrant NOTCH-I signaling and this activation seems to play a role in malignant FMT biology.

**Key words:** NOTCH-I, NICD, feline mammary tumours.

## LA FOSFORILAZIONE DELL'α1-GLICOPROTEINA ACIDA INFLUENZA L'ATTIVITÀ DI KILLING DEI NEUTROFILI E DEI MONOCITI BOVINI.

Lecchi Cristina<sup>a</sup>, Cavallini Alice<sup>a</sup>, Martino Piera Anna<sup>a</sup>, Sartorelli Paola<sup>ac</sup>,  
Scarafoni Alessio<sup>bc</sup>, Bronzo Valerio<sup>ac</sup>, Ceciliani Fabrizio<sup>ac</sup>

<sup>a</sup>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Milano. <sup>b</sup>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Milano. <sup>c</sup>Università di Milano, CISMA Centro Interdipartimentale di Studi sulla Ghiandola Mammaria, Milano

L'α1- glicoproteina acida (AGP) è una proteina sierica con pI molto basso (2.8-3.8) ed elevato contenuto di carboidrati (>40%). L'AGP bovina è un singolo polipeptide di 185 amminoacidi con un PM=43kDa, caratterizzato da 5 residui N-glicosilati e 7 potenziali siti di fosforilazione. L'AGP è una immunocalina, la cui concentrazione aumenta in corso di infiammazione.

Scopo di questo lavoro è valutare se la fosforilazione dell'AGP influenzi il killing batterico dei leucociti bovini. Monociti e neutrofili isolati sono stati incubati con concentrazioni crescenti (0,3-0,6-0,9 mg/ml) di AGP nativa purificata e di AGP-defosforilata (deP-AGP).

L'AGP nativa alla concentrazione rilevata nel sangue in corso di infiammazione (0,9 mg/ml) riduce di quattro volte il killing dei neutrofili ( $P \leq 0,05$ ) rispetto alla concentrazione fisiologica di proteina (0,3 mg/ml).

L'AGP nativa (0,9 mg/ml) rallenta il killing di *E. coli* da parte dei monociti dopo un'ora di co-incubazione: l'attività si riduce di 2 volte ( $P \leq 0,05$ ) quando confrontata con la proteina concentrata 0,3 mg/ml. Si osserva anche un effetto tempo, che determina l'aumento dell'attività di killing dopo 2 ore di incubazione con i batteri.

Per valutare l'effetto della fosforilazione sull'attività dell'AGP, le cellule sono state incubate con deP-AGP (0,9mg/ml), ottenuta trattando la proteina nativa con fosfatasi intestinale di vitello. La deP-AGP perde le sue capacità immunomodulatorie per quanto riguarda il killing dei neutrofili; il trattamento dei monociti con deP-AGP invece determina risultati simili a quelli ottenuti con AGP nativa: il killing si riduce di 2 volte dopo 1 ora di co-incubazione tra monociti ed *E. coli* ( $P \leq 0,05$ ), mentre risulta sovrapponibile al controllo dopo 2 ore.

Questi dati dimostrano che l'AGP è una proteina fortemente fosforilata e che il fosfato è in grado di influenzare l'attività della proteina.

**Parole chiave:** α1-glicoproteina acida, fosforilazione, fagocitosi, killing, leucociti.

## INTRODUZIONE

La risposta di fase acuta (APR) è regolata dalle citochine pro-infiammatorie, dall'ossido nitrico e dai glucocorticoidi (Gruys *et al.*, 2005). La APR determina la sintesi delle porpine di fase acuta (APP), la cui concentrazione plasmatica aumenta (APP positive) o diminuisce (APP negative) durante l'infiammazione (Gabay *et al.*, 1999). Le APP sono sintetizzate principalmente del fegato e nel bovino sono: SAA (Serum Amyloid A), Hp (Aptoglobina), LBP (LPS-binding protein) e AGP (alfa<sub>1</sub> glicoproteina acida).

L'AGP è una proteina sierica con *pI* molto basso (2.8-3.8) ed elevato contenuto di carboidrati (>40%). L'AGP bovina (boAGP) è un singolo polipeptide di 185 amminoacidi con un PM=43kDa, caratterizzata da 5 residui N-glicosilati e 7 potenziali siti di fosforilazione. L'AGP è una binding protein e una immunocalina.

L'analisi della boAGP con una elettroforesi 2D e una colorazione fluorescente hanno rilevato la presenza di tre isoforme: la prima non è fosforilata ed è eterogenea nella carica; la seconda è eterogenea sia nella carica che nel PM e ha anche un pattern glicosidico diverso; la terza, è eterogenea nella carica e fortemente fosforilata.

Le cellule target delle boAGP sono i monociti e i neutrofili. È stato dimostrato che la boAGP inibisce sia la degranulazione (Miranda-Ribera *et al.*, 2008) sia l'esplosione respiratoria (Rinaldi *et al.*, 2008) nei neutrofili; mentre nei monociti inibisce l'apoptosi (Cecilian *et al.*, 2007) e la chemiotassi (Lecchi *et al.*, 2008). L'inibizione della degranulazione e dell'apoptosi vengono perse quando la boAGP è desialilata.

Scopo di questo lavoro è valutare se la fosforilazione della boAGP influenzi il killing batterico dei leucociti bovini. Monociti e neutrofili isolati sono stati incubati con concentrazioni crescenti di AGP nativa purificata e di AGP-defosforilata (deP-AGP).

## MATERIALI E METODI

### Purificazione boAGP

Per tutti gli esperimenti condotti in questo studio sono state utilizzate aliquote di boAGP purificate da plasma di bovine sane. Sono state utilizzate tre concentrazioni di boAGP nativa: fisiologica (0,3 mg/ml), media (0,6 mg/ml) e patologica (0,9 mg/ml).

### Defosforilazione della boAGP

La rimozione del gruppo fosfato avviene enzimaticamente trattando la proteina con fosfatasi basica di intestino di vitello (7500 U/mg; 10 mg/mL). Il rapporto tra l'enzima e la boAGP è di: 0.25 U/μg di substrato proteico. La miscela di reazione viene incubata a 37°C/3 ore.

### Purificazione dei neutrofili

L'esperimento è stato condotto a partire da sangue intero di 4 bovine sane. 35ml di sangue sono stati centrifugati a 1000 x g per 20 minuti a 4°C; plasma e buffy coat sono stati scartati e il sangue restante è stato risospeso in PBS freddo e successivamente stratificato su 10ml di PERCOLL1.084g. I campioni sono stati centrifugati a 400 x g per 40 minuti a 20°C; il pellet di polimorfonucleati è stato trattato con soluzione lisante Red Blood lysis buffer per eliminare gli eritrociti.

### Purificazione dei monociti

L'esperimento è stato condotto a partire da sangue intero di 8 bovine sane. 72ml di sangue sono stati centrifugati a 1260 x g per 30 minuti a 18°C, l'anello di leucociti è stato prelevato, diluito in PBS e stratificato su FICOLL–Paque™ Plus. I campioni sono stati centrifugati a 700 x g per 30 minuti a 4°C. L'anello di cellule mononucleate è stato prelevato e trattato con Red blood cell lysis buffer per eliminare gli eritrociti. Al fine di separare i linfociti dai monociti, i mononucleati sono stati piastrati in piastre sterili da 96 pozzetti e incubati per 1 ora: i monociti aderiscono alla piastra, i linfociti presenti nel surnatante vengono eliminati.

### Opsonizzazione

*E. coli* (ATCC 25922) è stato opsonizzato con siero bovino:  $10^8$  batteri sono stati incubati per 30 minuti con HBSS+20% siero a 37°C.

### Killing

I neutrofili e i monociti ( $5 \times 10^5$  cellule) sono stati incubati per 2 ore in presenza di terreno completo (RPMI, 20mM HEPES, 100 UI penicillina, 100 µg/ml streptomina, 1% aminoacidi non essenziali, 10% FBS) senza alcuno stimolo e con boAGP nativa (0,3-0,6-0,9mg/ml) o con deP-AGP (0,9mg/ml). *E. coli* vivo ( $10^7$  batteri/ $5 \times 10^5$  cellule) è stato aggiunto per 3-15-30 min per i neutrofili e per 60-120 min per i monociti. Dopo l'aggiunta di antibiotico gentamicina (100 µg/ml) per 45 min, le cellule sono state lisate con 0,5% Triton X-100 e i campioni sono stati fatti crescere su terreno idoneo. La crescita delle colonie è espressa come UFC (Unità Formante Colonia).

## **RISULTATI**

### Neutrofili

L'incubazione con differenti concentrazioni di boAGP ha determinato una risposta dose-dipendente sulla attività di killing dei neutrofili. In particolare la concentrazione maggiore, simile a quella riscontrabile in corso di infiammazione (0,9mg/ml), determina una diminuzione dell'attività di killing dei neutrofili ( $P \leq 0,05$ ). Al contrario la deP-AGP perde completamente la capacità immunomodulatoria (figura 1).

### Monociti

I dati preliminari relativi ai monociti mostrano che dopo 1 ora di incubazione con *E. coli* i monociti riducono la attività di killing quando pre-incubati con AGP concentrata 0,9mg/ml ( $P \leq 0,05$ ); tale modulazione scompare dopo 2 ore di incubazione con i batteri. Una attività simile si osserva anche per la deP-AGP, che determina un rallentamento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del killing dei monociti dopo 1 ora di incubazione con *E. coli* (figura 2).

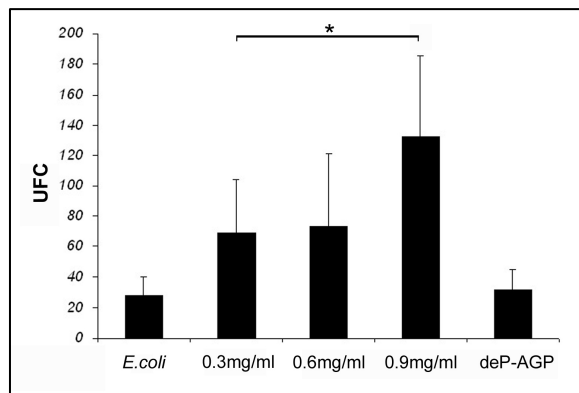
## **DISCUSSIONE**

Le attività dei neutrofili e dei monociti sono essenziali per un corretto sviluppo dell'immunità innata. In questo lavoro sperimentale abbiamo dimostrato che la boAGP, una proteina di fase acuta, può modulare, a concentrazioni patologiche (0,9 mg/ml), una delle più importanti attività dei leucociti: il killing intracellulare. Il significato biologico di questo risultato resta sconosciuto, ma è coerente con i dati ottenuti da studi precedenti, in cui si è dimostrato che la boAGP inibisce la degranulazione e l'esplosione respiratoria dei neutrofili (Miranda-Ribera *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2008). In questi due lavori è stato dimostrato come boAGP sia in grado di ridurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno sia a livello intracellulare che extracellulare (Rinaldi *et al.*, 2008), e come la stessa proteina sia in grado di ridurre la degranulazione (Miranda-Ribera *et al.*, 2008). Ne consegue quindi che l'AGP abbia come effetto quello di ridurre il killing dei batteri una volta fagocitati. Il meccanismo di inibizione del killing è probabilmente dovuto alla riduzione dell'esplosione respiratoria. Risulta quindi evidente che la boAGP a concentrazioni ematiche tipiche di uno stato patologico ha un potente effetto anti-infiammatorio. Inoltre abbiamo dimostrato che la modulazione dell'attività di killing è fortemente influenzata dalla fosforilazione della boAGP, poiché la proteina defosforilata perde le sue capacità immunomodulatorie sia nei neutrofili sia nei monociti. La fosforilazione è un importante meccanismo regolatorio che attiva o inibisce diversi pathways molecolari tramite modificazioni conformazionali strutturali delle proteine che li compongono. Ad esempio regola la trasduzione del segnale e la trascrizione genica. Fino ad oggi è stato dimostrato che le funzioni biologiche della AGP sono influenzate dai domini oligosaccaridici, che cambiano in corso di patologie. Infatti l'attività inibitoria sull'apoptosi dei monociti e sul respiratory burst dei

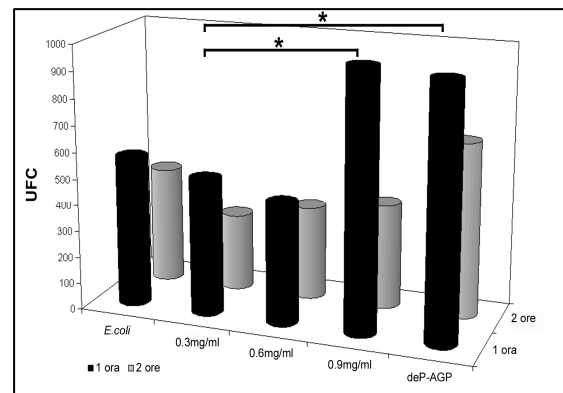
neutrofili vengono abolite quando la proteina è desialilata. In questo studio invece, abbiamo dimostrato per la prima volta che l'attività immunomodulatoria della boAGP è influenzata anche dalla fosforilazione.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Ceciliani F, Pocacqua V, Miranda-Ribera A, Bronzo V, Lecchi C, Sartorelli P (2007).  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116: 145–152.
- 2) Gabay C and Kushner I (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation, *The New England Journal of Medicine* 340 (6): 448-454.
- 3) Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins, *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 6B (11): 1045-1056.
- 4) Lecchi C, Ceciliani F, Bernasconi S, Franciosi F, Bronzo V, Sartorelli P (2008). Bovine alpha-1 acid glycoprotein can reduce the chemotaxis of bovine monocytes and modulate CD18 expression, *Veterinary Research* 39: 50-64.
- 5) Miranda-Ribera A, Lecchi C, Bronzo V, Scaccabarozzi L, Sartorelli P, Franciosi F, Ceciliani F (2008). Down-regulatory effect of alpha1-acid glycoprotein on bovine neutrophil degranulation, *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 33: 291–306.
- 6) Rinaldi M, Ceciliani F, Lecchi C, Moroni P, Bannerman DD (2008). Differential effects of alpha1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126(3-4):199-210.



**Figura 1** Killing di *E. coli* da parte dei neutrofili bovini trattati per 2 ore con boAGP nativa a differenti concentrazioni e con deP-AGP. I dati sono la media di 4 esperimenti indipendenti $\pm$ Est.



**Figura 2** Killing dopo 1 ora e dopo 2 ore di incubazione con *E. coli* da parte dei monociti bovini pre-incubati per 2 ore con boAGP nativa a differenti concentrazioni e con deP-AGP. I dati sono la media di 8 esperimenti indipendenti $\pm$ Est.

## PHOSPHORYLATION OF $\alpha$ 1-ACID GLYCOPROTEIN MODULATES BOVINE NEUTROPHIL AND MONOCYTE KILLING ACTIVITY

Alpha1-acid glycoprotein (AGP) is a serum protein with a very low *pI* (2.8-3.8) and a high carbohydrate content (>40%). Bovine AGP is a 43kDa polypeptide, 185 aminoacids long, N-glycosylated in 5 residues and with 6 potential phosphorylation sites. AGP is an immunocalin

and an acute phase protein: its serum concentration increase during inflammation. Both major (branching) and minor (sialylation) carbohydrate microheterogeneities are modified during systemic inflammation.

The aim was to elucidate the impact of phosphorylation on AGP's immunomodulatory functions. Bovine leucocytes were identified as cellular models because of their capability to phagocyte and kill bacteria. Isolated granulocytes and monocytes were incubated with increasing concentrations (0,3-0,6-0,9 mg/ml) of native and dephosphorylated AGP (deP-AGP).

Native AGP (at 0,9 mg/ml) down-regulated neutrophil killing capabilities with a reduction of four fold ( $P \leq 0,05$ ) in neutrophil and of two fold ( $P \leq 0,05$ ) in monocytes when compared with physiological concentration (0,3 mg/ml). After 2 hours the monocytes killing activity was the same as control.

The second part of this study was carried out by incubating the cells with deP-AGP (0,9 mg/ml) obtained by treating the native protein with Calf Intestinal Phosphatase. DeP-AGP apparently lost the immunomodulatory properties of the native protein concerning with killing of bacteria by neutrophils, while maintained the same monocytes killing capacity of native AGP.

This preliminary report demonstrate that AGP is a strongly phosphorylated protein, whom activities are likely to be mediated by its phosphate moiety.

**Key words:**  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, phosphorylation, phagocytosis, killing, leucocytes.

## VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE DEL PROGESTERONE TRAMITE QPCR ASSOLUTA NEI BOVINI

Uslenghi Federica<sup>1</sup>, Divari Sara<sup>1</sup>, Cannizzo Francesca Tiziana<sup>1</sup>, Demaria Raffaella<sup>1</sup>, Spada Francesca<sup>1</sup>, Mulasso Chiara<sup>1</sup>, Pezzolato Marzia<sup>2</sup>, Bozzetta Elena<sup>2</sup>, Attucci Alberto<sup>3</sup>, Giorgi Piero<sup>4</sup>, Biolatti Bartolomeo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Torino. <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta. <sup>3</sup>ASL CN1. <sup>4</sup>COOP Italia

Il 17 $\beta$ -estradiolo è fra gli ormoni steroidei più utilizzati negli allevamenti bovini per la sua azione anabolizzante, nonostante la Direttiva 96/22/ECC vieti l'utilizzo di tali sostanze a tutela della salute del consumatore.

Il 17 $\beta$ -estradiolo induce un aumento della sintesi proteica e conseguentemente della massa muscolare dell'animale. Regola molti geni che posseggono gli *oestrogen-responsive elements* attraverso il legame con due recettori nucleari: l'*estrogen receptor a* e l'*estrogen receptor b*, fra cui il gene codificante il recettore del progesterone (PR).

Nell'ottica di uno sviluppo di metodiche di biologia molecolare in grado di sopperire alle difficoltà dei metodi analitici chimici nell'evidenziare residui di molecole utilizzate sempre più a bassi dosaggi o di nuova sintesi, il nostro laboratorio ha sviluppato una PCR real time (qPCR) per determinare l'espressione del PR nelle ghiandole sessuali accessorie maschili che va incontro ad una maggiore trascrizione in seguito all'utilizzo di estrogeni. In questo studio abbiamo messo a punto una qPCR assoluta costruendo una curva standard con un plasmide contenente entrambe le sequenze geniche codificanti il PR e l'*housekeeping* (ciclofillina).

Abbiamo inoltre costruito una curva ROC per determinare il valore di cut off utile a separare la popolazione positiva da quella negativa sia per i vitelloni sia per i vitelli, sulla base di due distinti gruppi sperimentali di animali trattati con 17 $\beta$ -estradiolo paragonati ai rispettivi gruppi di controllo.

Infine abbiamo condotto uno studio in campo su 267 vitelloni e 240 vitelli provenienti da diversi allevamenti presenti sul territorio piemontese. Tra questi, 1 vitellone e 16 vitelli sono risultati positivi alla qPCR e presentavano lesioni istologiche iperplastiche e metaplastiche dell'epitelio delle ghiandole sessuali accessorie.

In conclusione la qPCR assoluta messa a punto risulta un metodo sensibile e specifico per evidenziare trattamento illecito con estrogeni attraverso l'attivazione della trascrizione di un marker genico.

**Parole chiave:** qPCR, anabolizzanti, 17 $\beta$ -estradiolo, bovini.

## EVALUATION OF PROGESTERONE RECEPTOR GENE EXPRESSION WITH ABSOLUTE QPCR IN BOVINES

Among the steroid hormones 17 $\beta$ -oestradiol (bE2) is the most widely used in animal husbandry as growth promoter, despite the ban in the EU with the Directive 96/22/ECC. bE2 influences the expression of several oestrogen-regulated genes, among these the progesterone receptor (PR) gene activity is greatly affected.

We already elaborated a real time quantitative PCR (qPCR) for the determination of the expression of PR gene in the bovine male sex accessory glands.

In this study an absolute qPCR has been performed. The standard curve was developed using a plasmid containing PR-housekeeping sequences. A ROC curve for beef cattle and one for calves were established on the basis of the results from two experimental groups of animal treated with bE2 and their relative controls. Furthermore the illicit use of bE2 has been monitored in field.

One sample among 267 beef cattle and 16 samples among 240 calves evaluated with qPCR resulted positive. Furthermore the positive animals showed the typical histologic changes of sex accessory glands induced by bE2.

In conclusion absolute qPCR to evaluate PR gene expression is a sensitive and specific method to determine the illicit use of oestrogen agents through the measure of activation of this marker.

**Key words:** qPCR, anabolics, 17 $\beta$ -oestradiol, bovine.

## VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI SAA E HP IN TESSUTI DI BOVINI SANI DOPO IDENTIFICAZIONE DI GENI DI RIFERIMENTO

**Dilda Francesca<sup>a</sup>, Lecchi Cristina<sup>a</sup>, Sartorelli Paola<sup>a,c</sup>, Ceciliani Fabrizio<sup>a,c</sup>**

*<sup>a</sup>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Milano. <sup>c</sup>CISMA Centro Interdipartimentale di Studi sulla Ghiandola Mammaria, Università degli Studi di Milano, Milano*

La risposta di fase acuta (APR) è la risposta di un animale nei confronti di un danno tissutale. L'APR è un processo dinamico indotto da citochine che comprende più fasi. Un aspetto fondamentale della APR coinvolge la modulazione delle proteine di fase acuta (APP), tra cui siero amiloide A (SAA) e aptoglobina (Hp), che vengono prodotte dal fegato in seguito a stimolazione, benché sia stata osservata una produzione anche a livello extraepatico.

La SAA è coinvolta in processi immunomodulatori, tra cui l'opsonizzazione dei batteri Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>. L'Hp nei bovini è espressa costitutivamente a bassi livelli, ma durante l'APR aumenta notevolmente. La sua principale attività è quella di legare l'emoglobina, prevenendo danni renali e perdita di ferro; inoltre, impedisce ai patogeni di utilizzare quest'elemento.

Per studiare l'espressione genica è necessario normalizzare i valori dell'RNA d'interesse con quelli dei geni di riferimento, l'espressione dei quali però può variare, soprattutto quando si analizzano tessuti diversi.

Ad oggi sono disponibili poche informazioni riguardanti l'espressione di SAA e Hp in tessuti di bovini sani. Dal momento che non esiste un metodo universale per analizzare i dati, questo studio ha validato la stabilità di 7 geni di riferimento (ACTB, GAPDH, HMBS, SDHA, YWHAZ, SF3A1, EEF1A2), comparando i risultati ottenuti con i programmi geNorm<sup>TM</sup> e NormFinder©. I geni di riferimento più stabili sono risultati essere SF3A1, HMBS e ACTB. SAA e Hp sono state, infine, quantificate nei tessuti analizzati, suggerendo una loro espressione anche in assenza di APR.

**Parole chiave:** APP, bovino, geni di riferimento.

## INTRODUZIONE

La risposta di fase acuta (APR) si scatena in seguito a un danno tissutale (12); è un processo dinamico mediato da citochine e comporta la modulazione delle proteine di fase acuta (APP) (6), tra cui la siero amiloide A (SAA) e l'aptoglobina (Hp). Le APP vengono prodotte dal fegato in seguito a stimolazione con citochine pro-infiammatorie, ma è stata osservata anche una produzione a livello extraepatico.

La SAA e l'Hp sono delle binding protein. La principale attività della Hp è quella di legare l'emoglobina libera, prevenendo danni renali e la perdita di ferro (16); impedendone anche l'utilizzo da parte dei batteri patogeni (5). La SAA è coinvolta in molti processi immunomodulatori tra cui l'opsonizzazione dei batteri Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup> (8;19).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'espressione di SAA e Hp in diversi tessuti bovini mediante qPCR. A tal fine sono stati prima identificati i geni di riferimento più stabili.

Sono stati presi in esame 7 geni di riferimento (ACTB, GAPDH, HMBS, SDHA, YWHAZ, SF3A1, EEF1A2) (8;4;23); analizzando i dati ottenuti con i programmi geNorm<sup>TM</sup> e NormFinder<sup>©</sup>; i geni di riferimento più stabili sono stati utilizzati per normalizzare i dati di espressione dell'RNA di SAA e Hp in 33 tessuti di bovini sani.

## MATERIALI E METODI

I tessuti sono stati prelevati da 2 bovini sani e conservati in RNAlater<sup>®</sup> (Sigma) (Tab. 2).

L'RNA totale è stato estratto utilizzando Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) e retrotrascritto con iSCRIPT cDNA SYNTHESIS Kit (Biorad). I cDNA ottenuti sono stati diluiti 1:2 ed una mix di tutti i cDNA è stata ottenuta unendo 2µl di ciascun campione.

La qPCR è stata allestita in 15µl di volume finale utilizzando Eva Green mix e primers specifici per ogni singolo gene (Tab.1). È

stata disegnata una curva standard effettuando diluizioni seriali della mix di cDNA in triplicato. I campioni sono stati analizzati in duplicato. Il profilo termico utilizzato per ogni gene è il seguente: 95°C per 90sec, 50 cicli a 95°C per 15sec e 60°C per 1min; per la costruzione della curva di melting: 55°C per 60sec e 80 cicli iniziando a 55°C e aumentando di 0.5°C ogni 10sec.

Per determinare quali fossero i geni di riferimento più stabili, sono stati utilizzati i programmi geNorm<sup>TM</sup> e NormFinder<sup>©</sup>. GeNorm<sup>TM</sup> genera un valore M, che deve essere inferiore a 1.5, affinché il gene considerato possa essere utilizzato come gene di riferimento; inoltre stabilisce il numero di geni di riferimento da utilizzare. NormFinder<sup>©</sup> genera una misura di stabilità (ρ) dove ad un valore più basso corrisponde un aumento di stabilità del gene.

## RISULTATI

Le curve standard di ciascun gene hanno generato un coefficiente di correlazione (r<sup>2</sup>) superiori a 0.993 e un'efficienza superiore al 92%.

I geni ACTB, SF3A1 e HMBS sono risultati essere i più stabili dopo analisi con geNorm<sup>TM</sup> (fig. 1A). Il numero ottimale di geni di riferimento fornito da geNorm<sup>TM</sup> è essere pari a 3.

Con NormFinder<sup>©</sup> è stato identificato come miglior gene HMBS, seguito da ACTB e GAPDH (fig.1B).

La quantificazione relativa di SAA e Hp è stata eseguita dopo normalizzazione con i geni ACTB, SF3A1 e HMBS (fig.2A-B).

L'espressione maggiore di SAA è stata rilevata nella tiroide, nell'apparato tegumentario, nel pancreas e nelle ghiandole sottomandibolari; un'espressione media si ha nell'apparato respiratorio, nell'intestino e nei monociti; un'espressione inferiore si nota nell'apparato urogenitale, nel sistema ematopoietico e in quello cardiovascolare; i livelli più bassi sono stati evidenziati nel

rene, nel cervello, nell'occhio e nella lingua.

Il livello d'espressione più alto di Hp è stato individuato nel pancreas, seguito da mammella, ghiandole salivari, sistema respiratorio, intestino, apparato urogenitale e cervelletto. Livelli molto bassi si rilevano nella pelle, nel sistema ematopoietico, nel rene, nel cervello, nell'occhio, nel sistema cardiovascolare, nell'esofago e nella lingua.

## DISCUSSIONE

Questo studio fornisce informazioni nuove sull'espressione extraepatica di SAA e Hp in differenti tessuti bovini.

Sebbene il fegato sia il principale produttore delle APP, è stato dimostrato come altri organi siano in grado di esprimere SAA e Hp (18; 25; 4; 14; 15; 21).

I livelli maggiori di SAA e Hp sono stati rilevati in organi comunicanti con l'esterno, il che potrebbe significare un meccanismo di difesa dell'ospite.

È interessante rilevare che SAA e Hp sono riscontrabili in tessuti di bovini sani, come già riportato da Dilda e colleghi (4).

Inoltre, abbiamo identificato un pannello di geni di riferimento per poter normalizzare i dati ottenuti dalla qPCR a partire da un elevato numero di campioni differenti.

La qPCR è una tecnica per misurare l'espressione genica che richiede l'individuazione di geni di normalizzazione stabili. È importante validare i geni di riferimento in base ai tessuti che si vogliono studiare e alle condizioni sperimentali (23).

Vandesompele e colleghi (28) hanno dimostrato che più di un gene di riferimento può essere utilizzato per ottenere una corretta normalizzazione. Nei bovini l'espressione di geni di riferimento è stata valutata in diversi tessuti (17; 3; 22; 24; 7;20; 2; 11; 29; 10).

Questo è il primo studio in cui sono stati valutati geni di riferimento per 33 tessuti bovini utilizzando i programmi geNorm™ e NormFinder®. Entrambi hanno identificato come migliori geni di riferimento SF3A1, HMBS, ACTB. La

stabilità stimata dai due programmi è la medesima, ad eccezione del GAPDH che è risultato essere più stabile di SF3A1 per NormFinder®.

I risultati hanno confermato che la mammella esprime l'RNA di entrambe le proteine anche in condizioni fisiologiche e non soltanto in corso di mastite (18).

Per la prima volta il pancreas viene identificato tra i principali organi di produzione extraepatica di SAA e Hp, anche se il ruolo fisiologico è ancora sconosciuto. Si può supporre che l'Hp intervenga nel meccanismo di difesa delle cellule pancreatiche grazie alla sua attività antiossidante. Attività protettiva che può essere attribuita anche alla SAA, che è in grado di inibire la produzione dello ione superossido.

Insieme ai peptidi antimicrobici prodotti dal pancreas, SAA e Hp potrebbero far parte del meccanismo di difesa dell'organo.

Per la prima volta è stata identificata la presenza di SAA a livello di tiroide, il cui significato biologico nel bovino non è ancora chiaro. Non è da escludere che la produzione locale di SAA sia coinvolta nello sviluppo della amiloidosi bovina (30), come già riportato in medicina umana (26).

## CONCLUSIONI

In conclusione, sebbene la maggior parte delle APP siano prodotte dal fegato, la SAA e l'Hp sono costitutivamente espresse nei tessuti bovini per fornire una prima linea di difesa dell'ospite.

Come geni normalizzatori per questo esperimento sono stati scelti SF3A1, HMBS e ACTB.

I dati ottenuti dalle qPCR hanno confermato la capacità di sintesi di queste proteine da parte della mammella e, dato ancor più interessante, da parte del pancreas e della tiroide.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. (2004). *Cancer Res.* **64**(15): 5245-50.

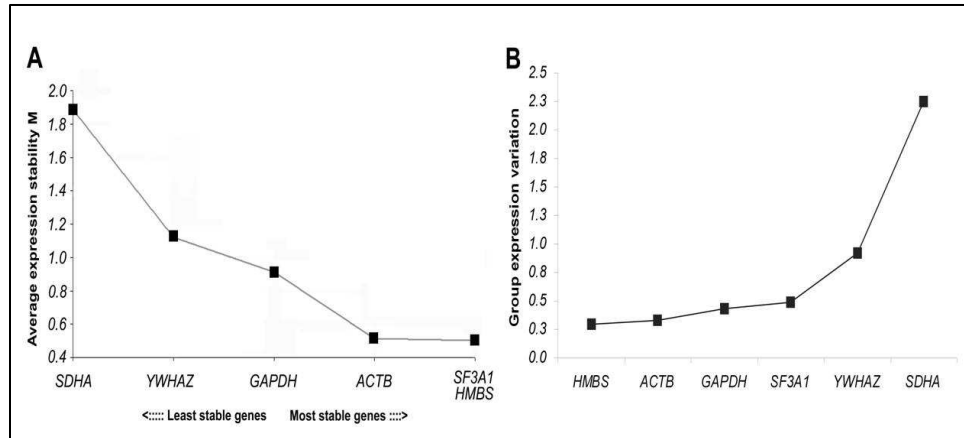
2. Bionaz M, Loor JJ. (2007). *Physiol. Genomics.*; **29**(3), 312-9.
3. De Ketelaere A, Goossens K, Peelman L, Burvenich C. (2006). *J Dairy Sci.*; **89**(10): 4066-9.
4. Dilda F, Pisani LF, Rahman MM, Modina S, Tessaro I, Sartorelli P, Ceciliani F, Lecchi C. (2011). *In press Vet. J.*
5. Eaton JW, Brandt P, Mahoney JR, Lee JT Jr. (1982). *Science*; **215**(4533): 691-93.
6. Gabay C and Kushner I. (1999). *N. Engl. J. Med.*, **340**(6): 448-54.
7. Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ. (2005). *BMC Dev Biol.*; **5**: 27.
8. Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. (2005). *J Biol Chem.*; **280**(19):18562-7.
9. Hirvonen J, Pyörälä S, Jousimies-Somer H. (1996). *J. Dairy Res.*; **63**: 351-60.
10. Hosseini A, Sauerwein H, Mielenz M. (2010). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*; **94**(5): e178-84.
11. Kadegowda AK, Bionaz M, Thering B, Piperova LS, Erdman RA, Loor JJ. (2009). *J. Dairy Sci.*; **92**(5): 2007-19.
12. Kushner I. (1982). *Ann. NY Acad Sci.*; **389**: 39-48.
13. Langlois MR, Delanghe JR. (1996). *Clin Chem* **42**: 1589–1600.
14. Lavery K, Gabler C, Day J, Killian G. (2004). *Anim. Reprod. Sci.*; **84**(1-2): 13-26.
15. Lecchi C, Avallone G, Giurovich M, Roccabianca P, Ceciliani F. (2009). *Vet. J.*; **180**(2): 256-8.
16. Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, Anbinder Y, Lache O, Nakhoul FM, Asaf R, Farbstein D, Pollak M, Soloveichik YZ, Strauss M, Alshiek J, Livshits A, Schwartz A, Awad H, Jad K, Goldenstein H. (2010). *Antioxid Redox Signal.*; **12**(2):293-304.
17. Lisowski P, Pierzchała M, Gościk J, Pareek CS, Zwierzchowski L. (2008). *J. Appl. Genet.*; **49**(4): 367-72.
18. McDonald TL, Larson MA, Mack DR, Weber A. (2001). *Vet Immunol. Immunopathol.*; **83**(3-4): 203-11.
19. Molenaar AJ, Harris DP, Rajan GH, Pearson ML, Callaghan MR, Sommer L, Farr VC, Oden KE, Miles MC, Petrova RS, Good LL, Singh K, McLaren RD, Prosser CG, Kim KS, Wieliczko RJ, Dines MH, Johannessen KM, Grigor MR, Davis SR, Stelwagen K. (2009). *Biomarkers.*; **14**(1): 26-37.
20. Pérez R, Tupac-Yupanqui I, Dunner S. (2008). *BMC Mol Biol.*; **9**:79.
21. Rahman MM, Lecchi C, Avallone G, Roccabianca P, Sartorelli P, Ceciliani F. (2010). *Vet. Immunol. Immunopathol.*; **137**: 28-35.
22. Robinson TL, Sutherland IA., Sutherland J. (2007). *Vet. Immunol. Immunopathol.*; **115**(1-2): 160-5.
23. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. (2000). *J. Biochem. Bioph. Meth.*; **46**(1-2): 69-81.
24. Spalenza V, Girolami F, Bevilacqua C, Riondato F, Rasero R, Nebbia C, Sacchi P, Martin P. (2010). *Vet. J.* [Epub ahead of print].
25. Upragarin N, Landman WJ, Gaastra W, Gruys E. (2005). *Histol. Histopathol.*; **20**(4): 1295-1307.
26. Urieli-Shoval S, Cohen P, Eisenberg S, Matzner Y. (1998). *J Histochem Cytochem.*; **46**(12): 1377-84.
27. van der Westhuyzen DR, de Beer FC, Webb NR. (2007). *Curr Opin Lipidol.* **18**(2):147-51
28. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). *Genome Biol.*; **3**(7):RESEARCH0034.
29. Walker CG, Meier S, Mitchell MD, Roche JR, Littlejohn M. (2009). *BMC Mol. Biol.*; **10**: 100.
30. Yamada M, Kotani Y, Nakamura K, Kobayashi Y, Horiuchi N, Doi T, Suzuki S, Sato N, Kanno T, Matsui T. (2006). *J Vet. Med. Sci.*; **68**(7): 725-9.

<b>Simbolo</b>	<b>Nome</b>	<b>Numero d'accesso</b>	<b>Funzione</b>	<b>Efficienza della PCR e coefficiente di regressione (<math>r^2</math>)</b>	<b>Forward 5'→3'</b>	<b>Reverse 5'→3'</b>
<b>β-Actina</b>	Beta actina	BT030480.1	Proteina strutturale del citoscheletro.	99.5% 0.994	CCAAAGCCAACCGTGAGA	CCAGAGTCCATGACAATGC
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	NM_001034034	Ossidoriduttasi in glicolisi e gluconeogenesi.	102% 0.997	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	CCCTCCACGATGCCAAAAGT
<b>HMBS</b>	Idrossimetil-bilane sintasi	NM_001046207.1	Sintesi del gruppo EME, metabolismo porfirina.	100.8% 0.998	GAGAGGAATGAAGTGGACCTAG	GCATCATAGGGGCTCTCCC
<b>SDHA</b>	Complesso succinato deidrogenasi, subunità A	NM_174178.2	Trasportatore di elettroni nel ciclo TCA e nella catena respiratoria.	97.7% 0.996	TGTATAATAGCTCACGCCCG	TCTATCAGATGGCCTCCTCAG
<b>YWHAZ</b>	Tirosina 3-monoossigenasi/triptofano 5-monoossigenasi activation protein, zeta polypeptide	NM_174814	Segnale di traduzione attraverso il legame a residui di serina fosforilati su una grande varietà di molecole di segnale.	92.3% 0.996	GCATCCCACAGACTATTTCC	GCAAAGACAATGACAGACCA
<b>SF3A1</b>	Splicing factor 3 subunità 1	NM_001081510	Componente strutturale del sistema di splicing.	96.5% 0.995	CCTTACCATGCCTACTACCGG	CACTTGGGCTTGAACCTTCTG
<b>EEF1A2</b>	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	BC108110.1	Attività come fattore di trascrizione e allungamento.	96.8% 0.993	GCAGCCATTGTGGAGATG	ACTTGCCCGCCTTCTGTG
<b>SAA</b>	Siero amiloide A	AF160867.2	Metabolismo lipidico e trasporto grassi; funzioni immuno-modulatorie.	94.9% 0.999	CCTGCTGGCCTGCCTGAC	GCTGCCTTCTGAGGACAGAG
<b>Hp</b>	Aptoglobina	NM_001040470	Legame con l'emoglobina libera; funzioni immunomodulatorie.	101.1% 0.996	CCAAGATGGTCTCCAGCAT	GTGAGGAGCCATCGTTCAATTG

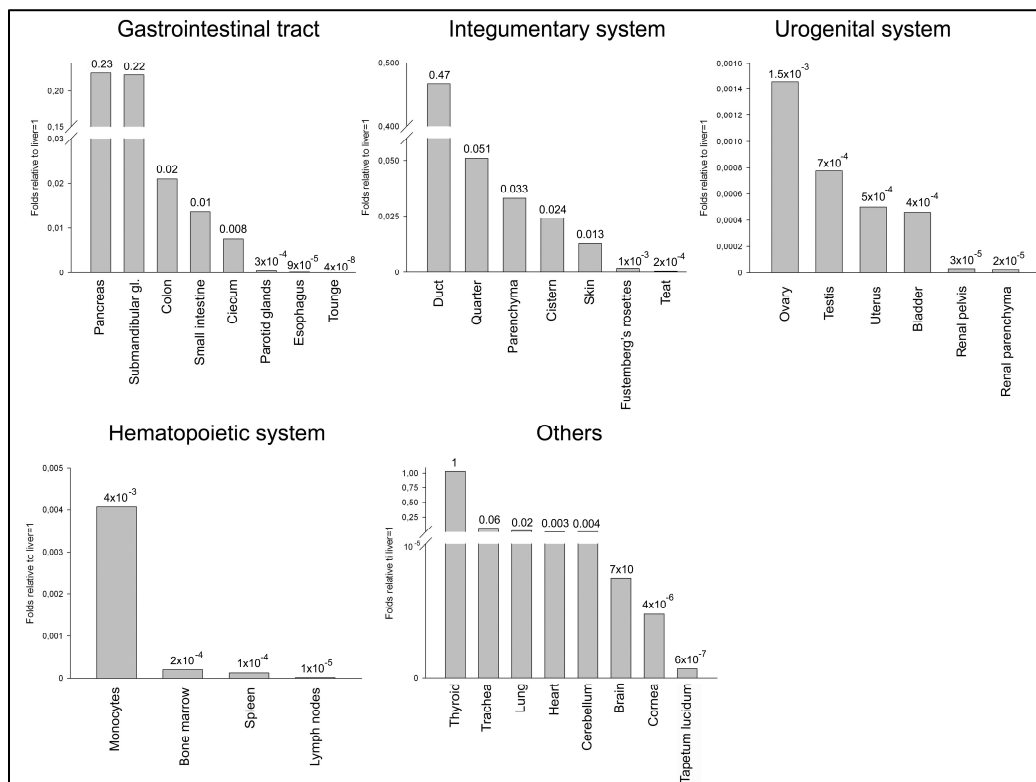
**Tabella 1** Primers dei geni candidati ad essere geni di riferimento e primers delle 2 proteine di fase acuta prese in esame, SAA e Hp.

<b>Tratto Gastrointestinale</b>	Lingua	
	Ghiandole Salivari	Parotidi Sottomandibolari
	Esofago	
	Intestino	Intestino Tenue Cieco Colon
	Fegato	
	Pancreas	
<b>Apparato Respiratorio</b>	Trachea	
	Polmone	
<b>Apparato Urogenitale</b>	Rene	Parenchima Renale Bacinetto Renale
	Vescica	
	Testicolo	
	Ovaio	
	Utero	
<b>Apparato Tegumentario</b>	Ghiandola Mammaria	Cisterna Dotto papillare Parenchima Quarto Isole Fürstenberg
	Pelle	
<b>Sistema Ematopoietico</b>	Midollo osseo	
	Linfonodo	
	Milza	
	Monociti	
<b>Tiroide</b>		
<b>Sistema Cardiovascolare</b>	Cuore	
	Aorta	
<b>Sistema Nervoso Centrale</b>	Cervello	
	Cervelletto	
<b>Occhio</b>	Cornea	
	Tappeto lucido	

**Tabella 2** Elenco dei tessuti utilizzati in questo studio.



**Figura 1** Grafici per la rappresentazione della stabilità dei geni candidati ad essere housekeeping in questo esperimento. (A) Rappresentazione della stabilità dei potenziali geni di riferimento per i tessuti di bovino selezionati, secondo l'analisi di geNorm™, che procede ad ogni step escludendo i geni che presentano i livelli di espressione relativa maggiormente variabili tra i tessuti analizzati; la linea soglia per l'eliminazione dei geni è stata stabilita essere un valore  $M \geq 1.5$ . Il valore M più basso corrisponde al gene più stabile, e quindi il migliore per normalizzare. (B) Rappresentazione della stabilità dei potenziali geni di riferimento per i tessuti di bovino selezionati, secondo l'analisi di NormFinder©; il valore più basso, anche in questo caso, evidenzia una maggiore stabilità del gene preso in esame.



**Figura 2** Espressione relativa nei tessuti di bovini sani di SAA(2A) e Hp(2B) studiata mediante qPCR.

## **WIDESPREAD EXPRESSION OF SAA AND HP MRNA IN BOVINE TISSUES AFTER EVALUATION OF SUITABLE REFERENCE GENES**

Acute-phase response (APR) refers to that of a host animal against any tissue injury. The APR is a dynamic process induced by cytokines, that results in modulation of acute phase proteins (APPs), a family of proteins including serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (Hp). They are produced by liver after stimulation, but extrahepatic expression has also been reported. Hp in cattle is constitutively expressed at low level and exhibits a high increase during APR. Hp main activity is to bind hemoglobin, preventing renal damages and iron loss during diseases, as well as inhibiting the utilization of iron by pathogens. SAA is involved in several immunomodulatory functions, which include the opsonization of Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup>.

To study RNA expression levels, a set of reference genes for normalization purpose is necessary, especially when the biological significance of subtle gene expression differences is studied. Reference genes expression can vary as the quantitative-PCR analysis compares different tissues.

Few information is available about the expression of SAA and Hp by a wide range of tissues. The aim of this work was to go in depth in this preliminary finding by studying the expression of the SAA and Hp in normal bovine tissues. As there is no universally accepted method to analyse the data, the present study validate the stability of 7 reference genes (ACTB, GAPDH, HMBS, SDHA, YWHAZ, SF3A1, EEF1A2) comparing the output by geNorm<sup>TM</sup> and NormFinder© softwares. The reference genes suggested are SF3A1, HMBS and ACTB. SAA and Hp were identified in tissues obtained from healthy animals, suggesting SAA and Hp expression in the absence of a systemic APR.

**Key words:** APP, cattle, reference genes.

## INDAGINI ISTOLOGICHE E BIOMOLECOLARI PER IL CONTROLLO DELL'USO ILLEGALE DEL 17 $\beta$ ESTRADIOLO NELLA SPECIE OVINA

**Puleio Roberto<sup>1</sup>, Tamburello Anna<sup>1</sup>, Schiavo Maria Rita<sup>1</sup>, Usticano Antonella<sup>1</sup>, Giardina Pippo<sup>4</sup>, Bozzetta Elena<sup>3</sup>, Loria Guido Ruggero<sup>1</sup>, Carruba Giuseppe<sup>2</sup>, Miceli Vitale<sup>2</sup>**

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia<sup>1</sup>. U.O. Oncologia Sperimentale, ARNAS Civico, Palermo<sup>2</sup>. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria, Valle D'Aosta<sup>3</sup>. AUSL 6 Palermo, Dipartimento di Prevenzione Veterinaria<sup>4</sup>*

L'Unione Europea pone il divieto assoluto dell'utilizzo del 17 $\beta$ -estradiolo con la Direttiva 2008/97 CE, demandando ai Servizi di Sanità Pubblica Veterinaria il controllo ufficiale sulla presenza di residui di sostanze anabolizzanti in alimenti di origine animale. A tale scopo ogni anno il Ministero della Salute emana il Piano Nazionale Residui (PNR) che permette la programmazione dei controlli ufficiali. Tra i vari metodi d'indagine è previsto l'utilizzo dell'esame istologico su organi bersaglio (Timo, Tiroide, Ghiandole sessuali accessorie), per individuare animali sottoposti illecitamente a trattamenti con sostanze anabolizzanti. La scelta dell'esame istologico, come metodo di screening, nasce dal fatto che le indagini ufficialmente riconosciute (esami biochimici), non permettono di individuare tutti gli animali sottoposti a trattamento illegale per il rapido metabolismo delle molecole utilizzate. In queste condizioni, l'esame istologico assume una notevole importanza, permettendo di individuare modificazioni in organi bersaglio di animali trattati, fino a 30 giorni dopo la somministrazione. In questo lavoro si riportano i risultati ottenuti da una sperimentazione condotta su ovini, cui è stato somministrato il 17 $\beta$ -estradiolo. Nei soggetti trattati si evidenziava una evidente metaplasia squamosa dell'uretra, con aumento marcato del numero degli strati dell'epitelio di rivestimento. L'IHC per ricerca di citocheratine 5-6 ha evidenziato la proliferazione delle cellule basali sia nell'uretra che nei dotti della prostata e delle ghiandole bulbo-uretrali. L'IHC per il recettore del progesterone ha mostrato una iperespressione rispetto ai controlli, delle cellule epiteliali dell'uretra e della prostata. Infine la RT-PCR ha messo in evidenza una iperespressione di specifici geni che codificano per il Recettore del Progesterone (PR), il fattore di crescita insulino-simile (IGF-I), il suo recettore (IGF-IR) e la proteina Trefoil Factor 3 (TFF3). La sperimentazione ha permesso da un canto di definire anche nella specie ovina lo standard istologico e immunoistochimico per futuri piani di sorveglianza, dall'altro di accoppiare all'analisi istologica, quella molecolare, allo scopo di individuare ed ottimizzare specifici markers biologici indiretti che potranno essere utilizzati per confermare in maniera più attendibile l'uso illecito di 17 $\beta$ -estradiolo in campioni prelevati al macello.

**Parole chiave:** 17 $\beta$ -estradiolo, immunoistochimica, RT-PCR.

### **HISTOPATHOLOGY, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND RT-PCR DETECTING 17 $\beta$ -ESTRADIOL TREATMENT IN SMALL RUMINANTS LIVESTOCK**

Aim of the study was to establish a new integrated diagnostic approach in order to develop screening tools against illegal hormonal treatments in small ruminants livestock production. We carried out a histological and molecular study, reliable in terms of accuracy and efficacy, to set up a screening test detecting lamb anabolic treatments. In our study we characterized the histological modification and gene expression variation induced in target organs by 17 $\beta$ -estradiol in 4 months aged lambs. In treated animals, the immunohistochemical (IHC) analysis revealed a clear squamous metaplasia of the urethra with a marked hyperplasia both in urethra and prostate gland. In addition, the IHC for progesterone receptor showed an overexpression if compared to control. Furthermore, RT-PCR assay, showed significant upregulation of four gene (IGF-I, IGF-IR, PR and TFF3) after treatment with 17 $\beta$ -estradiol. Our results indicate that the usefulness of IHC screening test, could be improved with the detection of indirect molecular biomarkers, to identify with a good accuracy, the illegal hormone treated animals.

**Key words:** 17 $\beta$ -estradiol, immunohistochemistry, RT-PCR.

## VALUTAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'INFETTIVITA' NELLE GHIANDOLE SALIVARI E NELLA SALIVA DI OVINI AFETTI DA SCRAPIE

Vascellari Marta<sup>1\*</sup>, Nonno Romolo<sup>2</sup>, Fragkiadaki Eirini, Bigolaro Michela<sup>1</sup>, Di Bari Michele Angelo<sup>2</sup>, Marcon Stefano<sup>2</sup>, D'Agostino Claudio<sup>2</sup>, Vaccari Gabriele<sup>2</sup>, Conte Michela<sup>2</sup>, De Grossi Luigi<sup>3</sup>, Rosone Francesca<sup>3</sup>, Giordani Francesco<sup>3</sup>, Agrimi Umberto<sup>2</sup>, Mutinelli Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy. <sup>2</sup>Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy. <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Viterbo, Italy

La Scrapie è una malattia neurodegenerativa e trasmissibile della pecora e della capra, appartenente al gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST), o malattie da prioni. Gli scopi del presente studio sono stati: identificare e quantificare la presenza della PrP<sup>Sc</sup> nelle ghiandole salivari di pecore sperimentalmente e naturalmente infette da scrapie; valutare e quantificare la presenza di infettività nella saliva e nelle ghiandole salivari di ovini affetti da scrapie mediante inoculo in modelli animali altamente sensibili alla scrapie e in ovini.

Le ghiandole salivari parotide, mandibolare e buccale di ovini sperimentalmente e naturalmente infetti da scrapie sono state valutate per la presenza di PrP<sup>Sc</sup>, con metodo WB e immunoistochimica. Campioni di saliva ottenuti da ovini con scrapie naturale in fase clinica, sono stati inoculati per via intracerebrale in arvicola (*Myodes glareolus*), previa liofilizzazione, e per via orale negli ovini. Campioni di ghiandola parotide e di ghiandola mandibolare di un ovino infetto da scrapie, sono stati inoculati per via intracerebrale in arvicola.

Il WB ha evidenziato depositi di PrP<sup>Sc</sup> patologica in tutti i distretti esaminati, già in fase preclinica di malattia. Le colorazioni di doppia immunoistochimica con anticorpi anti PrP e anti caderina E hanno evidenziato la presenza di immunoprecipitati a carico delle cellule acinari e duttali del parenchima ghiandolare. Gli inoculi di ghiandole salivari hanno trasmesso la malattia alle arvicole, ed è stato possibile stimare che il titolo infettante delle ghiandole salivari è almeno 2 ordini di grandezza inferiore a quello del SNC. Non sono stati ancora osservati casi clinici né nelle arvicole inoculate con saliva (400 dpi) né negli ovini (44 mesi p.i.).

I dati ottenuti dimostrano che l'accumulo di prioni nelle ghiandole salivari di pecore con scrapie è un fenomeno comune, e che il coinvolgimento delle ghiandole salivari è successivo alla neuro-invasione. La mancanza di trasmissione degli inoculi di saliva osservata fino ad ora è compatibile con livelli di infettività inferiori di oltre 4 ordini di grandezza rispetto al cervello.

**Parole chiave:** ghiandole salivari, immunoistochimica, infettività, saliva, scrapie.

### INFECTIVITY IN SALIVARY GLANDS AND SALIVA OF SCRAPIE AFFECTED SHEEP

The parotid, mandibular and buccal salivary glands of naturally and experimentally scrapie-affected sheep were investigated for the presence of PrP<sup>Sc</sup> by WB and IHC. PrP<sup>Sc</sup> was detected in all the investigated glands, from 16 months post infection. Double immunohistochemical staining, indicated that the acinar and ductal epithelium of salivary glands are involved in PrP<sup>Sc</sup> accumulation.

The presence of infectivity in saliva of scrapie affected sheep was investigated by bioassay in bank voles (*Myodes glareolus*) and in sheep. At 400 dpi in bank voles and 44 weeks post infection in sheep, no evidence of scrapie transmission was observed. These data are consistent with low levels of infectivity in saliva.

The presence of infectivity in salivary glands from clinically affected sheep was investigated by bioassay in bank voles. Voles were challenged with 10% homogenates from parotid gland and mandibular gland from a sheep with natural scrapie. Inocula from salivary glands induced disease in voles, but with longer survival time and lower attack rate compared to the brain. We estimated that the prion titre in salivary glands is at least 2 orders of magnitude lower than in brain.

**Key words:** immunohistochemistry, infectivity, saliva, salivary glands, scrapie.

## **PATOLOGIA MALFORMATIVA NEL VITELLO: CONTRIBUTO CASISTICO**

**Binanti Diana, Prati Irene, Sironi Giuseppe, Riccaboni Pietro**

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Reparto di Anatomia Patologica, Polo di Lodi, Università degli Studi di Milano*

La patologia malformativa nel bovino rappresenta un evento relativamente raro, con prevalenze variabili, secondo la letteratura, dallo 0.2% al 3%. Benché molto spesso non sia possibile individuarne la causa, molti sono i fattori ritenuti responsabili, tra questi ricordiamo agenti virali, chimici, ambientali, alimentari nonché genetici.

A partire dal 2006, durante l'attività diagnostica necroscopica presso il reparto di Anatomia Patologica del Polo Universitario di Lodi, su un totale di 208 vitelli esaminati, in 68 soggetti sono stati osservati e descritti quadri patologici su base malformativa. Nel 62% dei casi le malformazioni si presentavano singole, nel 27% erano multiple e localizzate in unico apparato, mentre nell'11% dei casi si presentavano multiple e localizzate in più apparati. Le malformazioni riguardavano l'apparato cardiocircolatorio (67%), l'apparato digerente (10%), il sistema nervoso (10%), l'apparato urogenitale (6%), l'apparato locomotore (4%), l'apparato respiratorio (2%) e l'intero corpo (1%).

La prevalenza della patologia malformativa nella nostra casistica appare oltremodo elevata e solo in parte giustificata dalla posizione privilegiata di un centro diagnostico incardinato in una struttura ospedaliera. La prassi di eliminare soggetti evidentemente malformati ostacola, infatti, i tentativi di monitoraggio fornendo quindi una generale sottostima di un complesso problema multifattoriale dell'allevamento bovino.

**Parole chiave:** vitello, malformazioni, difetti congeniti.

### **MALFORMATIONS IN CALVES: A RETROSPECTIVE STUDY**

Malformations in cattle represents a relatively rare event with a variable prevalence, from 0.2% to 3%. Identification of the cause is often impossible. However many factors are responsible, among them viral agents, chemical, environmental, nutritional and genetic factors have the highest importance. Since 2006, at the Pathology Unit of the University Veterinary Hospital of Lodi, a total of 208 calves were examined. Among them 68 animals with malformation were observed. In 62% of the cases the malformations were single, 27% were multiple and localized in one systems, while 11% of cases were localized in several systems. The malformations involved the cardiovascular system (67%), the digestive system (10%), the nervous system (10%), the urogenital tract (6%), the musculoskeletal system (4%), the respiratory system (2%) and the total body (1%). The prevalence of the malformations in our study material was high. This is partially justified by the location of the diagnostic center in a hospital, however the common practice of eliminating of the severe malformed animals, could cause underestimation of a complex multifactorial problem of cattle.

**Key words :** calf, malformations, congenital defects.

## VALUTAZIONI ISTOPATOLOGICHE SU LESIONI TUBERCOLOTICHE INDOTTE IN TOPI KNOCK-OUT PER IL GENE IRF-8

**Rocca Stefano<sup>4</sup>, Anfossi Antonio<sup>4</sup>, Delogu Giovanni<sup>3</sup>, Schiavoni Giovanna<sup>1</sup>, Sali Michela<sup>3</sup>, Palucci Ivana<sup>3</sup>, Abalsamo Laura<sup>1</sup>, Mattei Fabrizio<sup>1</sup>, Sanchez Massimo<sup>1</sup>, Palma Carla<sup>2</sup>, Leoni Antonio<sup>4</sup>, Fadda Giovanni<sup>3</sup>, Belardelli Filippo<sup>1</sup>, Gabriele Lucia<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Cell Biology and Neurosciences, and* <sup>2</sup>*Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.* <sup>3</sup>*Institute of Microbiology, Catholic University of the Sacred Heart, Rome.* <sup>4</sup>*Department of Pathology and Veterinary Clinic, University of Sassari*

Lo studio della risposta innata e adattiva è da sempre un utile strumento per comprendere meglio la patogenesi delle infezioni. In particolare nelle patologie ove è coinvolta la risposta cellulo-mediata il confine tra risposta efficiente, inefficiente o addirittura dannosa, per l'organismo stesso, è molto sottile. Questo aspetto assume particolare importanza nella infezioni sostenute da micobatteri tubercolari. Un ruolo di primo piano viene sicuramente svolto dalle cellule dendritiche (DC) le quali hanno un compito fondamentale nella risposta immunitaria. Il gene IRF-8 (ICSBP), viene espresso da tutte le cellule ematopoietiche, essa è di fondamentale importanza per il processo di maturazione e differenziazione delle DC, ma anche per la stimolazione dei linfociti T CD4+, la sintesi di IL 12 e la stimolazione della sintesi di interferone I. Lo studio dei meccanismi immunopatologici in corso di infezioni, ha da tempo trovato uno slancio efficace con l'utilizzo di modelli murini resi silenti (knock-out) per geni codificanti molecole particolarmente importanti nella risposta immunitaria. Soggetti KO per IRF-8 hanno dimostrato una maggiore suscettibilità allo sviluppo di infezioni virali e batteriche e talvolta di tumori. In questo contributo abbiamo osservato in topi KO e WT per il gene IRF-8 sperimentalmente infettati con Mtb, le differenze nello sviluppo delle lesioni nei polmoni e l'evoluzione della risposta immunitaria a 8, 15 e 30 giorni. Le stesse osservazioni sono state condotte in topi KO e WT immunizzati con BCG e un vaccino a DNA capace di esprimere una proteina immunogena di Mtb (HBHA) e successivamente sperimentalmente infettati, onde valutare le differenze nella risposta adattativa al micobatterio anche in soggetti vaccinati. Le valutazioni del danno sono state eseguite su sezioni istologiche seguendo uno schema di misurazione e grading score delle stesse, mentre le sottopopolazioni linfocitarie sono state marcate con i seguenti anticorpi: CD3, CD4, CD8, CD103, FoxP3, F4/80, DEC205, CD11b e 7/4 e osservate in immunofluorescenza indiretta al microscopio confocale.

**Parole chiave:** *Mycobacterium tuberculosis*, immunofluorescenza, Mtb, wild-type (WT).

### HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF THE LESIONS INDUCED BY TUBERCULOSIS IN KNOCK-OUT MICE FOR THE GENE IRF-8

The study of the innate and adaptative immunity is a profit tool to understand better the pathogenesis of the infections. Particularly, in the pathologies where is involved the Th-1 answer, the border among efficient immunity, inefficient or straight harmful for the same organism it is very thin. This aspect assumes particular importance in the infections sustained by tubercular mycobacterioses. In fact, currently, has not been elucidated completely in that way the immune system responds to the injury of bacterium during his pathological action. The maturation and differentiation of dendritics cells (DC) confers they two important functions: the synthesis of IL-12 and the activation of the MHC II. The gene IRF-8 (ICSBP), is expressed by all the haematopoietic cells, it is of fundamental importance for the process of maturation and differentiation of the DC, but also for the stimulation of T-lymphocytes CD4+, the synthesis of IL-12 and the stimulation of the synthesis of interferon I. In this study we observed mice KO and WT for the gene IRF-8 experimentally infected, the differences in the development of the lesions in the lungs and the evolution of the answer immune system to 8, 15 and 30 days. The same observations have been conducted in groups of mice KO and WT immunized with BCG and DNA vaccine to able express a immunogenic protein of Mtb (HBHA). The evaluations of the damage are been performed on histological sections following a scheme of measurement and classification. For the evaluation of lymphocyte immunophenotypes, the slides has been marked with the following antibodies: CD3, CD4, CD8, CD103, FoxP3, F4/80, DEC205, CD11b, 7/4 and observed in indirect immunofluorescence to the confocal microscope.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, immunofluorescence, Mtb, wild-type (WT).

## LINFOMA STADIO V: RELAZIONE TRA INFILTRAZIONE MIDOLLARE E CITOPENIE PERIFERICHE NEL CANE

**Martini Valeria, Gelain Maria Elena, Comazzi Stefano**

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano.*

La stadiazione clinica WHO del linfoma canino prevede la divisione in 5 stadi in base al coinvolgimento di linfonodi (I-III), fegato/milza (IV), sangue periferico, midollo o altri organi (V). Le linee guida del VCOG (Veterinary Cooperative Oncology Group) consigliano di valutare il midollo solo nei cani con citopenia, mancando linee guida per la tecnica di valutazione e per le scelte terapeutiche in base all'infiltrazione. Alcuni autori hanno però segnalato che stadi inferiori al V possono avere tempi di sopravvivenza migliori. Scopo di questo studio retrospettivo è valutare la correlazione tra alterazioni ematologiche e infiltrazione midollare valutata tramite citofluorimetria in cani con linfoma B a grandi cellule.

Sono stati inclusi 60 cani per cui fossero disponibili esame emocromocitometrico, striscio ematico e midollare e citofluorimetria di linfonodo, sangue e midollo osseo. Il livello di infiltrazione è stato definito come percentuale di cellule CD21+ ad alto forward scatter.

Alterazioni periferiche erano presenti in 30 cani (17 anemici, 15 trombocitopenici, 11 con linfocitosi, 5 con cellule atipiche e 11 con infiltrazione >15%). 14 casi avevano alterazioni ematologiche multiple.

L'infiltrazione midollare era  $10,09\% \pm 16,14$  (mediana 3,05); in 43 casi era <10%, in 8 compresa tra 10 e 20%, in 9 >20%. L'infiltrazione midollare risulta significativamente associata a trombocitopenia, linfocitosi e infiltrazione ematica ( $p=0,00$ ), ma non ad anemia o cellule atipiche ( $p=0,56$ ;  $p=0,36$ ).

I nostri risultati suggeriscono l'opportunità di valutare sempre il midollo, anche se trombocitopenia o linfocitosi possono indicare la presenza di infiltrazione.

**Parole chiave:** linfoma, midollo, stadiazione.

## INTRODUZIONE

Il sistema di stadiazione WHO per il linfoma canino prevede la divisione in cinque stadi in base a coinvolgimento di linfonodi (stadi I-III), milza-fegato (stadio IV), sangue-midollo o altri organi (stadio V). Nel 2010, il Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) ha redatto le linee guida per la quantificazione della malattia prima e dopo terapia. Queste linee guida non richiedono la valutazione del midollo se non in presenza di marcate citopenie periferiche che possano indicare una grave infiltrazione midollare, in quanto non esistono tecniche standardizzate per quantificarne il coinvolgimento, il valore prognostico dell'infiltrazione non è ufficialmente riconosciuto, e non esistono indicazioni chiare per un diverso approccio terapeutico in presenza di V stadio.

Recentemente però alcuni autori hanno dimostrato come la citofluorimetria possa essere un utile strumento per quantificare l'infiltrazione midollare in cani con linfoma B a grandi cellule. Un altro studio ha identificato come la presenza, al momento della diagnosi, di alcune caratteristiche tra cui l'assenza di coinvolgimento midollare, sia legata al 95% di probabilità di sopravvivenza a due anni. In passato, inoltre, è stato dimostrato come in cani con infiltrazione midollare sia necessaria una chemioterapia più aggressiva.

Scopo di questo lavoro è stato di verificare se l'infiltrazione midollare sia correlata alla presenza di alterazioni del sangue periferico in cani con linfoma B a grandi cellule.

## MATERIALI E METODI

Abbiamo selezionato in modo retrospettivo 60 cani con diagnosi di linfoma B a grandi cellule, per i quali fossero disponibili un esame emocromocitometrico completo (Sysmex XT-2000iV), uno striscio ematico colorato con *May-Grunwald-Giemsa*, e dati citofluorimetrici (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, California) di aspirato linfonodale, sangue periferico e midollo osseo.

Il livello di infiltrazione di sangue periferico e midollo osseo è stato definito come percentuale di cellule CD21+ ad elevato forward-scatter. Ai fini statistici, i soggetti sono stati suddivisi in 3 gruppi in funzione dell'infiltrazione periferica, utilizzando cut-off arbitrari del 5% e 15%, e in funzione dell'infiltrazione midollare utilizzando

cut-off del 10% e 20%, che corrispondono rispettivamente alla media dei nostri campioni e al cut-off utilizzato in letteratura.

Le statistiche sono state eseguite tramite software statistico standard (SPSS Statistics 17.0). La differenza nella percentuale di infiltrazione midollare in base alla presenza di anemia, trombocitopenia, linfocitosi e cellule atipiche è stata valutata con test di Mann-Whitney; la differenza tra i tre livelli di infiltrazione ematica con test di Kruskal-Wallis. La correlazione tra entità delle alterazioni e infiltrazione midollare è stata valutata con test di Spearman. Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

30 cani su 60 presentavano alterazioni periferiche, così suddivise: 17 anemia, 15 trombocitopenia, 11 linfocitosi, 5 cellule a morfologia atipica; 11 avevano infiltrazione ematica superiore al 15%; 14 avevano alterazioni multiple. Nessuno aveva alterazioni a carico dei granulociti.

L'infiltrazione midollare era  $10,09\% \pm 16,14$  (mediana 3,05); in 43 casi era  $< 10\%$ , in 8 compresa tra 10 e 20%, in 9  $> 20\%$  (figura 1).

L'entità dell'infiltrazione midollare era statisticamente diversa nei tre livelli di infiltrazione ematica ( $p=0,00$ ) e nei cani con trombocitopenia e linfocitosi rispetto a quelli normali ( $p=0,00$ ), ma non nei soggetti con anemia o cellule atipiche ( $p=0,56$  e  $p=0,36$ ). Inoltre, è risultata correlata alla trombocitopenia, linfocitosi e infiltrazione ematica ( $p=0,00$ ), ma non ad anemia o cellule atipiche ( $p=0,32$  e  $p=0,41$ ).

## DISCUSSIONE

In medicina umana, la stadiazione del linfoma prevede sempre la valutazione del midollo osseo, anche tramite l'associazione di istologia e citofluorimetria, in modo da aumentare la sensibilità nella ricerca delle cellule neoplastiche. Secondo le linee guida ufficiali, invece, il prelievo del midollo non è sempre necessario nel cane, a meno che siano presenti gravi citopenie periferiche. Tuttavia, ad oggi nessuno ha indagato la correlazione tra le alterazioni periferiche e il coinvolgimento midollare.

Per questo lavoro sono stati selezionati cani con linfoma B a grandi cellule perché per essi, per mezzo della citofluorimetria, è più facile il riconoscimento e quindi la quantificazione delle

cellule neoplastiche sia in circolo che nel midollo osseo. Per questa ragione, non abbiamo ritenuto necessario distinguere i diversi sottotipi morfologici che possono rientrare nella classe dei linfomi a grandi cellule, anche alla luce del fatto che i preparati citologici da aspirato linfonodale erano disponibili solo per un numero ridotto di casi.

La citofluorimetria è più difficilmente applicabile ai linfomi a piccole cellule, in quanto piccoli linfociti sono normalmente presenti sia nel sangue che nel midollo e non sono differenziabili dalla popolazione neoplastica, a meno che questa presenti un pattern antigenico aberrante. Un utile strumento per questi sottotipi potrebbe essere la PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangement), spesso utilizzata in medicina umana per valutare la malattia minima residua, ma il suo utilizzo è ancora poco diffuso in medicina veterinaria, a causa della scarsità di primer specifici.

La correlazione tra trombocitopenia e infiltrazione midollare potrebbe essere dovuta alla breve emivita piastrinica e quindi ad una riduzione del numero di piastrine circolanti in fasi precoci dell'infiltrazione midollare, o alla presenza di forme immunomEDIATE, che in medicina umana sono spesso associate al linfoma.

I soggetti con linfocitosi non sempre presentavano grave infiltrazione ematica. Questo permette di ipotizzare che tale alterazione possa essere dovuta anche ad altre condizioni fisiologiche o patologiche associate, che non ci è stato possibile indagare a causa della carenza di dati anamnestici.

Benchè il coinvolgimento midollare sia risultato associato all'infiltrazione periferica, in alcuni casi questa era superiore al 15% con un midollo poco infiltrato. Questo può essere dovuto ad un over-spill dai linfonodi o da altri organi come la milza, repleti di cellule neoplastiche che passano direttamente in circolo senza prima colonizzare il midollo osseo.

L'anemia è ufficialmente riconosciuta come fattore prognostico negativo per i cani con linfoma. L'assenza di correlazione con l'infiltrazione midollare evidenzia come questa alterazione possa essere dovuta anche ad altre cause, come forme immunomEDIATE o patologie concomitanti.

Solo cinque casi nel presente studio avevano in circolo cellule con morfologia atipica. In genere, tali cellule erano di dimensioni medio-grandi, con elevato rapporto nucleo-citoplasma, nucleo tondo o irregolare con cromatina finemente

reticolare o irregolarmente addensata e talora nucleoli evidenti, e citoplasma da scarso a moderato lievemente basofilo. La discrepanza tra il numero di casi che presentavano queste cellule atipiche e quelli con infiltrazione del sangue periferico superiore al 15% potrebbe indicare come la citofluorimetria sia un metodo nettamente più sensibile della semplice analisi morfologica per individuare le cellule neoplastiche in circolo, anche perché queste potrebbero assumere un aspetto difficilmente differenziabile da quello dei linfociti maturi. In questo lavoro la presenza di cellule atipiche non era associata al grado di infiltrazione midollare: ciò potrebbe essere dovuto al ridotto numero di casi che presentavano questa alterazione periferica, o alla presenza in circolo di cellule neoplastiche per overspill dai linfonodi e non per infiltrazione midollare.

## CONCLUSIONI

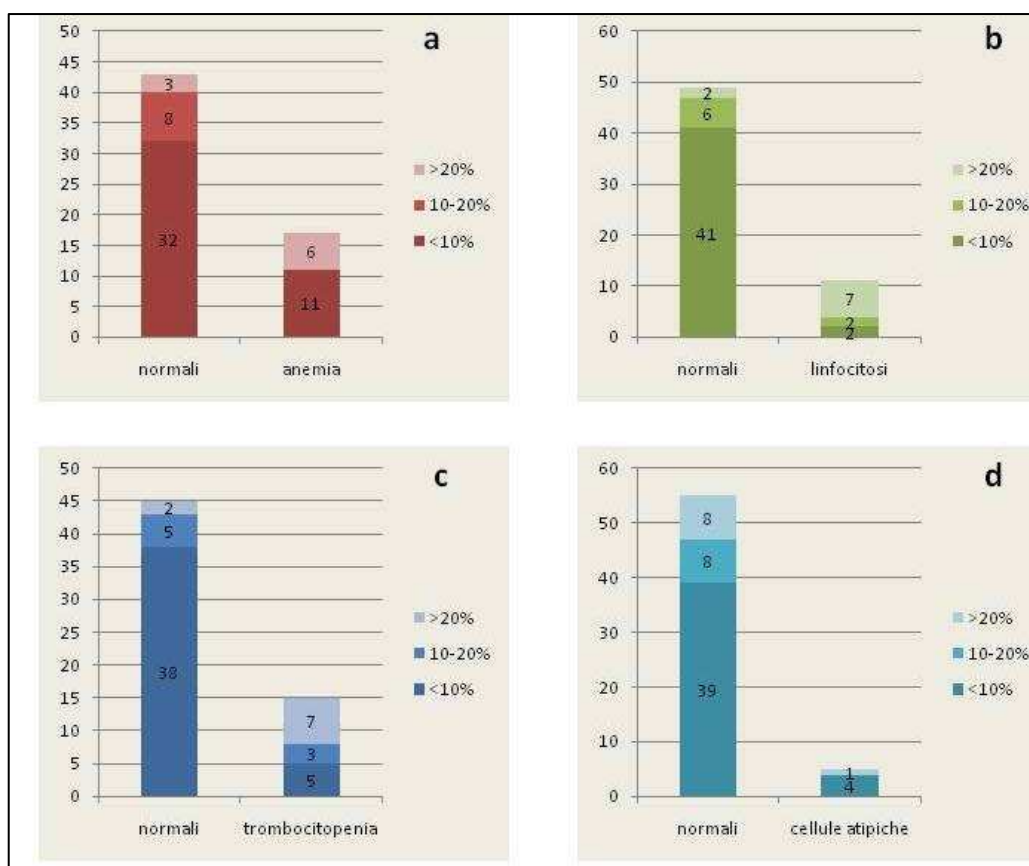
Questo lavoro ha dimostrato l'utilità di valutare il coinvolgimento midollare anche in cani che non presentano citopenie periferiche, in contrasto con quanto indicato dalle linee-guida del VCOG.

Ulteriori studi su una più ampia casistica, corredata di follow-up dei singoli soggetti, potrebbero essere utili per valutare più chiaramente il ruolo prognostico del coinvolgimento midollare ed il relativo cut-off. Tali dati potrebbero essere valutati anche in funzione del singolo sottotipo morfologico, al fine di stabilire l'esatto comportamento biologico delle diverse forme per poter in futuro disegnare terapie più mirate possibile.

## BIBLIOGRAFIA

- Vail DM, Young KM. Hematopoietic tumors, in S.J. Withrow and D.M. Vail: Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology, quarta ed. Saunders Elsevier 2007.
- Vail DM, Michels GM, et al. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0)—a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol* 2010 Mar;8(1):28-37.
- Marconato L, Bonfanti U et al. Cytosine Arabinoside in addition to VCAA-based protocols for the treatment of canine lymphoma with bone marrow involvement: does it make the difference? *Vet Comp Oncol* 2008 Jun;6(2):80-9

- Marconato L, Stefanello D et al. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 2011 Feb;238(4):480-485
- Gelain Me, Pintore L et al. Utilità dell'analisi citofluorimetrica nella definizione del coinvolgimento midollare nei linfomi B del cane. VII Congresso Nazionale AIPVET, Castelsardo, 17-18 giugno 2010
- Talaulikar D, Shadbolt B et al. Routine use of ancillary investigations in staging diffuse large B-cell lymphoma improves the international Prognostic index (IPI). *J Hematol Oncol* 2009 Nov 22;2:49
- Burnett RC, Vernau W et al. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol* 2003;40:32-41
- Hauswirth AW, Skrabs C et al. Autoimmune thrombocytopenia in non-Hodgkin's lymphomas. *Haematol* 2008 Mar;93(3):447-50
- Abbo HA, Lucroy MD. Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). *J Am Vet Med Assoc* 2007 Dec 15;231(12):1836-42



**Figura 1** Distribuzione delle classi di infiltrazione midollare in soggetti normali e con anemia (a), linfocitosi (b), trombocitopenia (c), e cellule atipiche (d).

## **CANINE STAGE V LYMPHOMA: BONE MARROW INVOLVEMENT AND PERIPHERAL CYTOPENIAS**

WHO clinical staging system for canine lymphoma is based on the involvement of lymph nodes (I-III), liver and/or spleen (IV), peripheral blood, bone marrow or any other tissue (V). VCOG (Veterinary Cooperative Oncology Group) guidelines suggest to evaluate bone marrow only in dogs with peripheral cytopenias, due to the lack of standard techniques for evaluation or decision-making guidelines. However, some authors reported a better prognosis in stage III dogs. Aim of this retrospective work was to evaluate the correlation between peripheral blood abnormalities and bone marrow involvement in dogs with large B-cell lymphoma. 60 dogs were included, for which were available a CBC, peripheral blood and bone marrow smears, and lymph node, peripheral blood and bone marrow flow cytometry. The involvement level was defined as CD21+ high forward scatter cells percentage.

Peripheral blood abnormalities were seen in 30 dogs (17 anemic, 15 thrombocytopenic, 11 with lymphocytosis, 5 atypical cells, 11 infiltration > 15%). 14 dogs had multiple alterations.

Bone marrow involvement was 10,09%  $\pm$  16,14 (median 3,05); it was <10% in 43 dogs, between 10 and 20% in 8 and >20% in 9. Bone marrow involvement was associated with thrombocytopenia, lymphocytosis and blood infiltration ( $p=0,00$ ), but not with anemia and atypical cells ( $p=0,56$ ;  $p=0,36$ ).

The lack of correlation between blood abnormalities and bone marrow infiltration suggests the opportunity to evaluate bone marrow in all dogs with lymphoma, even if thrombocytopenia and lymphocytosis can indicate an involvement.

**Key words:** lymphoma, bone marrow, staging.

## VEGF E MMP-9 CROSS-TALK: POSSIBILI BIOMARCATORI NEL LINFOMA CANINO

Aricò Arianna<sup>1</sup>, Comazzi Stefano<sup>2</sup>, Gelain Maria Elena<sup>2</sup>, Riondato Fulvio<sup>3</sup>, Martini Valeria<sup>2</sup>, Aresu Luca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova.* <sup>2</sup>*Dipartimento di Patologia, Igiene e Salute Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano.*

<sup>3</sup>*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino*

In medicina umana, i fattori angiogenici ed alcune citochine sono considerati biomarcatori estremamente significativi nella diagnosi precoce e nella prognosi di linfoma. Vascular endothelial growth factor (VEGF) rappresenta uno dei più potenti e specifici promotori dell'angiogenesi tumorale, mentre metalloproteasi 2 e 9 (MMP-2 e -9) sono capaci di regolarla direttamente. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) può stimolare direttamente la produzione di VEGF e MMP ed è considerato un regolatore della proliferazione e differenziazione delle cellule ematopoietiche. Allo scopo di identificare dei possibili marcatori prognostici, in questo lavoro sono stati studiati, mediante tecnica ELISA, VEGF e TGF- $\beta$  plasmatici e, mediante zimografia, MMP-2 e -9 in 37 cani affetti da linfoma (21 linfoma B e 16 linfoma T), di cui 13 casi seguiti durante l'iter chemioterapico (10 linfoma B e 3 linfoma T). Sono stati selezionati 10 controlli sani. I cani affetti da linfoma presentavano livelli plasmatici più alti di VEGF ( $p < 0.05$ ) e di attività catalitica per MMP-9 (act-MMP-9) rispetto ai controlli ( $p < 0.01$ ). I linfomi T presentavano una più alta concentrazione di act-MMP-9 e VEGF al tempo della diagnosi rispetto ai linfomi B. Analizzando i livelli plasmatici durante chemioterapia, act-MMP-9 e VEGF mostravano una diminuzione in 8 linfomi B su 9 ( $p < 0.01$ ); al contrario nei linfomi T i valori rimanevano stabili nel corso della terapia. Si è riscontrata inoltre in tutti i linfomi una correlazione positiva tra i livelli plasmatici di act-MMP-9 e VEGF ( $p < 0.001$ ). Nei casi di linfoma, la media dei livelli plasmatici di TGF- $\beta$  è più bassa rispetto ai controlli. I nostri risultati suggeriscono che VEGF e MMP-9 possano rappresentare dei buoni indicatori della risposta al trattamento chemioterapico nei linfomi B.

**Parole chiave:** chemioterapia, linfoma canino, MMP-9, prognosi, VEGF.

## VEGF AND MMP-9 CROSS-TALK: POSSIBLE BIOMARKERS IN CANINE LYMPHOMA

Angiogenic factors and cytokines are reported as useful biomarkers in early diagnosis and follow-up of human lymphoma. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent and specific promoters of angiogenesis. Metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) are able to regulate angiogenesis directly. During the cancerogenesis, transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) stimulates the production of VEGF and MMP and represents an immunosuppressant of proliferation and differentiation of hematopoietic cells. In this work, we tested VEGF and TGF- $\beta$  plasma levels by ELISA and MMP-2 and -9 by gelatin zymography in 37 lymphoma-affected dogs (21 B-cell lymphoma and 16 T-cell lymphoma) and 13 were also examined during chemotherapy (10 B-cell lymphoma and 3 T-cell lymphoma). Ten healthy controls were included. Lymphoma affected dogs showed significant higher catalytic activity of MMP-9 ( $p < 0.01$ ) and higher plasma VEGF levels ( $p < 0.05$ ) respect control dogs. T-cell lymphomas presented a higher concentration of act-MMP-9 and VEGF at time of diagnosis than B-cell lymphomas. Focusing on the plasma levels during chemotherapy treatment, act-MMP-9 and VEGF had a significantly decreased in 8 B-cell lymphoma out 9 ( $p < 0.01$ ). Thus, a positive correlation between concentrations of act-MMP-9 and plasmatic levels of VEGF ( $p < 0.001$ ) was found in all lymphoma-affected dogs. In tumor-bearing dogs, the mean value for plasma TGF- $\beta$  was lower than in healthy controls. Our analysis suggests that VEGF and MMP-9 might be good predictors of treatment response in B-cell lymphoma.

**Key words:** canine lymphoma, chemotherapy MMP-9, prognosis, VEGF.

## MOLECOLE DI ADESIONE E METALLOPROTEASI: INDAGINE SUL RUOLO DI CD44s e MMP-9 NELLE NEOPLASIE EMATOPOIETICHE CANINE

Martini Valeria<sup>1</sup>, Aricò Arianna<sup>2</sup>, Aresu Luca<sup>2</sup>, Giantin Mery<sup>2</sup>, Riondato Fulvio<sup>3</sup>, Comazzi Stefano<sup>1</sup>, Gelain Maria Elena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia, Igiene e Salute Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano. <sup>2</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova. <sup>3</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino

Il recettore per l'acido ialuronico CD44 media l'interazione tra cellule e matrice extracellulare (ECM) e sia la forma standard (CD44s) sia le sue varianti sono coinvolte nella crescita e diffusione neoplastica, interagendo con fattori angiogenici e metalloproteasi, favorendo la capacità metastatizzante delle cellule neoplastiche. Scopo del lavoro è stato valutare l'espressione di CD44s e MMP-9 in cani con neoplasie linfoidi. Sono stati analizzati 61 campioni di sangue: 15 cani controllo, 7 leucemie acute (ALL/AUL), 8 leucemie linfocitiche croniche (CLL), 31 linfomi (20 B di cui 8 stadio V; 11 T di cui 4 stadio V). In 17 linfomi B e 10 T sono stati analizzati aspirati linfonodali. I valori di intensità media di fluorescenza (MFI) di CD44 sono stati misurati con citometria a flusso e rapportati all'MFI di CD45. L'espressione di MMP-9 è stata valutata a livello proteico e genico in 12 casi di leucemie (ALL/AUL e CLL) e 15 linfomi con immunocitochimica e Real Time RT-PCR. Il CD44 MFI nei linfociti era maggiore in tutti i casi patologici rispetto ai controlli, in particolare nelle ALL/AUL, linfomi V stadio e CLL ( $P < 0.01$ ), con una particolare over-espressione nelle ALL/AUL rispetto alle altre forme leucemiche ( $P = 0.001$ ) e diminuzioni significative di CD45 solo nelle ALL/AUL e nei linfomi B V. Nei linfomi V stadio, il CD44 nei linfociti circolanti era maggiore rispetto ai linfomi non leucemici ( $p = 0.018$ ). In tutte le forme leucemiche, i valori mediani del CD44/CD45 ratio erano maggiore di 1. Rispetto ai linfomi, le leucemie hanno evidenziato un CD44 MFI, un'intensità di positività ed un'espressione di MMP-9 significativamente maggiori ( $P = 0.01$ ,  $P = 0.03$ ,  $P < 0.001$ ). Questi dati sembrano indicare come CD44s e MMP-9 siano coinvolti nello sviluppo e progressione delle forme leucemiche.

**Parole chiave:** CD44, MMP-9, cane, neoplasia ematopoietiche.

### ADHESION MOLECULES AND METALLOPROTEINASES: ROLE OF CD44s AND MMP-9 IN CANINE HEMATOPOIETIC NEOPLASMS

Hyaluronan receptor CD44 mediates interaction between cells and extracellular matrix (ECM). The standard form (CD44s) and its variants are involved in tumor progression and metastatic spread by recruitment and activation of surface-associated matrix metalloproteinases. In this work, expression of CD44s and MMP-9 was evaluated on peripheral blood and fine needle aspiration (FNA) of lymph nodes in canine lymphoid neoplasm. CD44 flow cytometric mean fluorescent intensity (MFI) was measured on 61 peripheral blood and compared with CD45 MFI: 15 control dogs, 7 acute leukemia (ALL/AUL), 8 chronic lymphocytic leukemia (CLL), 31 lymphomas (20 B-cell, 8 stage V; 11 T-cell, 4 stage V). In 27 lymphomas both peripheral blood and FNA were analyzed. Protein and mRNA expression of MMP-9 were investigated in 12 leukemia cases and 15 lymphomas by immunocytochemistry and real time RT-PCR. Compared to control, CD44 MFI was higher in all pathological cases, in particular in ALL/AUL, stage V lymphomas and CLL ( $P < 0.01$ ), with over expression in ALL/AUL compared to other leukemic samples ( $P = 0.001$ ). Only stage V B-cell lymphoma and ALL/AUL showed a significantly decrease of CD45. Peripheral lymphocytes in stage V lymphoma had higher CD44 MFI compared to stage III-IV lymphomas ( $P = 0.018$ ). All leukemic samples showed a median CD44/CD45 ratio higher than 1. Compared to lymphomas, leukemia samples showed a significantly higher CD44 MFI, MMP-9 staining pattern and mRNA up-regulation ( $P = 0.01$ ,  $P = 0.03$ ,  $P < 0.001$ ). These preliminary data may suggest that CD44 and MMP-9 could be involved in molecular mechanisms beneath the progression of leukemic disorders.

**Key words:** CD44, MMP-9, dog, hematopoietic neoplasm.

## VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI HEAT SHOCK PROTEINS E PATHWAY MOLECOLARI CORRELATI NELL'OSTEOSARCOMA CANINO

Romanucci Mariarita<sup>1</sup>, Bongiovanni Laura<sup>1</sup>, D'Amato Giuliana<sup>1</sup>, Malatesta Daniela<sup>1</sup>, Palmieri Chiara<sup>1</sup>, Buracco Paolo<sup>2</sup>, De Maria Raffaella<sup>2</sup>, Della Salda Leonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo. <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino

Numerosi studi condotti in medicina umana hanno messo in evidenza il valore prognostico e le implicazioni terapeutiche che alterati livelli di espressione delle Heat Shock Proteins (HSPs) rivestono nell'ambito di varie categorie di neoplasie, tra cui l'osteosarcoma (OSA). Poiché l'OSA umano e canino mostrano numerose analogie per quanto riguarda sia il comportamento biologico che le caratteristiche molecolari, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'espressione immunoistochimica di Hsp27, Hsp72, Hsp73, Hsp90 nel modello di OSA canino, in correlazione con il grado istologico ed il tempo di sopravvivenza, nonché di molecole correlate all'Hsp90, quali survivina e  $\beta$ -catenina, al fine di stabilirne il potenziale valore prognostico e/o terapeutico. L'analisi dei risultati è stata effettuata con metodo semi-quantitativo. Hsp27, Hsp73 e Hsp90 hanno evidenziato un'immunoreattività non correlabile con il grado istologico o il tempo di sopravvivenza. Tuttavia, il riscontro di positività moderate o intense dell'Hsp90 nella maggior parte dei campioni esaminati, nonché negli emboli neoplastici, suggerisce l'ipotesi che l'Hsp90 possa rappresentare un target molecolare nella terapia dell'OSA canino. Inoltre, l'intensità e le percentuali più elevate di espressione ( $\geq 75\%$ ) dell'Hsp72 osservate negli OSA di grado III, nonché l'assenza di immunoreattività riscontrata nei soggetti con elevato tempo di sopravvivenza, suggeriscono un potenziale valore prognostico negativo dell'espressione di tale proteina. Infine, sebbene livelli variabili di espressione nucleare della survivina siano stati osservati in tutti i campioni esaminati, l'entità di tale espressione non è risultata in correlazione con quella dell'Hsp90. Per quanto riguarda invece la  $\beta$ -catenina, è stata evidenziata una correlazione tra la presenza di espressione di tale proteina in sede nucleare ed un elevato tempo di sopravvivenza.

**Parole chiave:** Heat Shock Proteins, survivina,  $\beta$ -catenina, osteosarcoma, cane.

### EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEINS AND CORRELATED MOLECULAR PATHWAYS IN CANINE OSTEOSARCOMA

Abnormal levels of Heat Shock Proteins (HSPs) have been observed in many human neoplasms, demonstrating both prognostic and therapeutic implications. Since human and canine osteosarcoma (OSA) share several biological and molecular features, the aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of Hsp27, Hsp72, Hsp73, Hsp90 in canine OSA model, in relation to histological grade and overall survival (OS), as well as to expression of Hsp90 correlated molecules, such as survivin and  $\beta$ -catenin, in order to investigate their potential prognostic and/or therapeutic value. A semi-quantitative method was used to analyse results. Immunoreactivity of Hsp27, Hsp73 and Hsp90 was not associated with histological grade or OS. However, widespread Hsp90 immunoreactivity detected in tumour cases and neoplastic emboli suggests that this protein can represent a potential molecular target for therapy of canine OSA. For Hsp72, immunosignal intensity and percentage of positive cells were highest ( $\geq 75\%$ ) in grade III, whereas absent immunolabelling appeared to be associated with prolonged OS, thus suggesting a poor prognostic value of Hsp72 expression in canine OSA. Even though survivin nuclear immunosignal was detected in all cases, it did not appear to be correlated to Hsp90 expression. On the other hand, a correlation between the presence of  $\beta$ -catenin nuclear immunolabelling and a longer OS was found.

**Key words:** Heat Shock Proteins, survivin,  $\beta$ -catenin, osteosarcoma, dog.

## **RUOLO DEL PATHWAY PDGFRS/PDGFS NELL'OSTEOSARCOMA CANINO: STUDIO DI BERSAGLI MOLECOLARI PER STRATEGIE TERAPEUTICHE INNOVATIVE**

**Maniscalco Lorella<sup>1</sup>, Iussich Selina<sup>1</sup>, Morello Emanuela<sup>1</sup>, Martano Marina<sup>1</sup>, Buracco Paolo<sup>1</sup>, Biolatti Bartolomeo<sup>1</sup>, Della Salda Leonardo<sup>2</sup>, Tirrito Federica<sup>1</sup>, De Maria Raffaella<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Sezione Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino. <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*

PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$  sono recettori tirosina chinasi overespressi nel 70-80% degli osteosarcomi (OSA) umani e sono un target molecolare per l'utilizzo di specifici TKI (inibitori tirosina chinasi) in diversi tumori umani. L'OSA canino rappresenta un ottimo modello in oncologia comparata in quanto possiede caratteristiche istopatologiche e cliniche simili a quello umano. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'espressione di PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  e dei loro specifici ligandi PDGF-A e PDGF-B in 28 OSA canini mediante tecnica immunohistochimica e in 7 linee cellulari primarie di OSA canino mediante Western Blot e q-PCR. I dati immunohistochimici hanno rivelato una positività rispettivamente del 40% e del 34% per PDGF-A e per PDGF-B, mentre del 71,4% e l'84% PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$ . L'analisi mediante q-PCR ha permesso di evidenziare che tutte le linee di osteosarcoma over-esprimono PDGFR $\alpha$ , 4 linee esprimono sia PDGFR $\beta$  che PDGF-A mentre nessuna linea cellulare esprime PDGF B. Questi dati sono stati confermati mediante tecnica di Western Blot. I risultati ottenuti da questa ricerca dimostrano che sia PDGFRs che PDGFs sono espressi e hanno una distribuzione analoga a quella presente nell'osteosarcoma umano. Essi dimostrano inoltre che il pathway PDGFRs/PDGFs svolge un ruolo chiave nella patogenesi di questo tumore, che PDGFR $\alpha$  e  $\beta$  possono essere utilizzati come target molecolare per il trattamento dell'OSA canino con specifici TKI e per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative in oncologia comparata.

**Parole chiave:** PDGFRs, PDGFs, osteosarcoma canino, oncologia comparata, target therapy.

### **PDGFS/PDGFRS IN CANINE OSTEOSARCOMAS: NEW TARGETS FOR INNOVATIVE THERAPEUTICAL STRATEGIES**

PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$  are tyrosine kinases receptors overexpressed in 70-80% of human osteosarcomas (OSA) representing a suitable target for clinical use of specific kinases inhibitors (TKI). Canine OSA shows histopathological and clinical features similar to human OSA and it is considered an excellent model in comparative oncology. In this study we investigated PDGF-A, PDGF-B, PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$  expression in 28 canine OSA by immunohistochemistry and in 7 primaries canine OSA cell lines by Western Blot and q-PCR. Immunohistochemical data showed that PDGF-A and PDGF-B are expressed respectively in 40% and 34% of the OSA analyzed while PDGFR $\alpha$  and PDGFR $\beta$  were expressed in 71,4% and 84%. Quantitative PCR data showed that all canine OSA cell lines overexpressed PDGFR $\alpha$  and only 4/7 overexpress PDGFR $\beta$  and PDGF-A if compared to normal osteoblastic cell line. These data were also confirmed by Western Blot analysis. These results showed that PDGFRs/PDGFs are co-expressed in canine osteosarcomas and that this pathway plays an important role in this pathogenesis. Moreover these data suggest as PDGFRs can be used as suitable targets for the treatment of canine OSA with specific TKI and for the development of new strategies in human cancer therapy.

**Key words:** PDGFs, PDGFRs, canine osteosarcoma, comparative oncology, target therapy.

## LA 17-AAG, UN POTENTE INIBITORE DELL'HSP90, INDUCE EFFETTI ANTIPROLIFERATIVI E PROAPOPTOTICI NELLA LINEA CELLULARE D22 DI OSTEOSARCOMA CANINO

Malatesta Daniela, Palmieri Chiara, Bongiovanni Laura, Romanucci Mariarita, Nori Cesira, Buracco Paolo<sup>o</sup>, De Maria Raffaella<sup>o</sup>, De Martinis Massimo\*, Ginaldi Lia\*, Della Salda Leonardo

*Faculty of Veterinary Medicine, Teramo, Italy.*<sup>o</sup> *Faculty of Veterinary Medicine, Torino, Italy.*

*\*Faculty of Medicine, L'Aquila, Italy*

L'osteosarcoma (OSA), il tumore primitivo dell'osso più comune nei bambini e nel cane, rappresenta una neoplasia altamente aggressiva la cui resistenza alla chemioterapia convenzionale promuove la continua ricerca di nuovi farmaci. Recentemente, la heat shock protein 90 (Hsp90), "chaperone molecolare" che promuove la maturazione conformazionale e la stabilizzazione di numerose molecole (*client proteins*) implicate nell'insorgenza e trasformazione maligna di numerose neoplasie, è stata proposta quale potenziale bersaglio terapeutico. La sua inibizione determina la degradazione di varie *client proteins* quali la p53 mutata. La prima classe di inibitori è rappresentata dalla geldanamicina e dai suoi derivati semi-sintetici, tra cui la 17-allilamino-17-demetossigeldanamicina (17-AAG), usata con successo in *trials* clinici relativi a numerose neoplasie maligne dell'uomo.

La linea cellulare D22 di osteosarcoma canino è stata trattata con differenti concentrazioni (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1  $\mu$ M) di 17-AAG per 12, 24 e 48 ore per la valutazione dell'apoptosi mediante citofluorimetria a flusso e immunofluorescenza per caspase 3 attiva, mentre l'esame ultrastrutturale è stato condotto dopo inclusione in resina epossidica.

Il trattamento con 17-AAG ha indotto una riduzione della vitalità cellulare, un'inibizione della crescita, elevati livelli di apoptosi tempo- e dose-dipendente, mentre dal punto di vista ultrastrutturale ha indotto aumento del pleomorfismo cellulare, alterazioni dei lamellipodi, "bubbles" e "blisters" superficiali, vacuolizzazione citoplasmatica, aumentato sviluppo del RER, degenerazione mitocondriale, aumento del numero di ribosomi e lisosomi. Segni di autofagocitosi sono stati osservati già dopo 12 ore di trattamento a basse dosi di 17-AAG (0.025-0.05  $\mu$ M), mentre apoptosi e necrosi aumentano in modo direttamente proporzionale all'aumentare delle dosi del farmaco e del tempo di esposizione. Degna di nota è stata l'evidenziazione della presenza della cosiddetta "mitofagia" o autofagia mitocondriale (associazione mitocondri-RER, formazione di "membrane di isolamento", autofagosomi).

L'inibizione dell'Hsp90, indotta dal trattamento con 17-AAG, potrebbe quindi rappresentare un target utile anche nel trattamento dell'osteosarcoma del cane.

**Parole chiave:** 17-AAG, osteosarcoma, apoptosi, autofagia, cane.

## THE HSP90 INHIBITOR 17-AAG INDUCES ANTIPROLIFERATIVE AND PROAPOPTOTIC EFFECTS IN CANINE OSTEOSARCOMA CELL LINE D22

Osteosarcoma (OSA) is an aggressive neoplasia and the most common primary bone tumor of children and dog, highly resistant to chemotherapy. Recently, heat shock protein 90 (Hsp90), an ubiquitous molecular chaperone promoting the conformational maturation and stabilization of numerous client proteins, molecules which play important roles in tumoral progression, has been recognized as a potential target for therapy in cancer. Hsp90 inhibition has been shown to promote increased degradation of client proteins such as mutant p53. The first class of Hsp90 inhibitors was based on geldanamycin and its semi-synthetic derivatives, such as 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG), which has been successfully used in clinical trials against different human tumours.

Canine OSA cell line D22 was treated with different concentrations of 17-AAG (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1  $\mu$ M) and apoptosis was evaluated by immunofluorescence for active caspase 3 and flow cytometry. Ultrastructural analysis was performed after epoxy resin embedding.

17-AAG treatment promoted strong induction of apoptosis in a time- and dose-dependent manner. Transmission electron microscopy revealed in 17-AAG-treated cells an increased pleomorphism, lamellipodia modifications, surface bubbles and blisters, cytoplasmic vacuolation, increased RER, mitochondrial degeneration, high number of ribosomes and lysosomes. Morphological signs of autophagy first appeared after 12 hrs at low doses of 17-AAG (0.025-0.05  $\mu$ M), while apoptosis and necrosis were positively correlated with time and dose. Noteworthy is the identification of the so-called mitophagy or mitochondrial autophagy (mitochondria-RER association, isolation membrane formation, autophagosomes).

The present, *in vitro* data strongly suggest that Hsp90 inhibition may represent an useful target in the therapy of osteosarcoma.

**Key words:** 17-AAG, apoptosis, autophagy, osteosarcoma, dog.

## PARAMETRI PROGNOSTICI NEI TUMORI PERIVASCOLARI DEL CANE

**Avallone Giancarlo<sup>1</sup>, Boracchi Patrizia<sup>2</sup>, Stefanello Damiano<sup>3</sup>, Ferrari Roberta<sup>3</sup>, Roccabianca Paola<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>DIPAV, <sup>3</sup>DSC, Facoltà di Medicina Veterinaria, <sup>2</sup> Sezione di Statistica Medica e Biometria, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano*

Nel cane i sarcomi dei tessuti molli (STM) costituiscono il 15% delle neoplasie sottocutanee. In oncologia veterinaria, gli STM sono considerati come un singolo gruppo clinico patologico indipendentemente dall'istotipo specifico. Lo scopo di questo studio è di valutare il ruolo prognostico di alcuni parametri patologici nei tumori perivascolari del cane (TPV), considerati come gruppo distinto, e di confrontarlo con quanto riportato in letteratura per l'intera categoria degli STM. Sono stati esaminati cinquantasei TPV, di cui è stato raccolto il *follow up*, e sono stati valutati sede di sviluppo, dimensioni del tumore, margini di escissione, profondità della lesione, tipo di crescita, grado, quantità di necrosi, mitosi e indice di proliferazione valutato con immunistochemica per Ki67. L'associazione tra le variabili ed il loro ruolo prognostico sono stati analizzati statisticamente (test del Chi quadro, analisi delle corrispondenze multiple, curve di Kaplan Meier, modello di Cox, Indice C di Harrel). I casi con margini liberi non hanno recidivato. Le dimensioni del tumore erano significativamente associate alla recidiva. La profondità della lesione era associata alla recidiva ma era caratterizzata da una bassa capacità predittiva. L'associazione tra sede, stato dei margini, profondità e tipo di crescita ha permesso di identificare dei profili patologici significativamente associati alla recidiva. Grado, mitosi, indice di proliferazione e necrosi non si correlavano con la recidiva. L'assenza di associazione identificabile tra il grado e la recidiva si discosta da quanto riportato in letteratura. Le recidive dei TPV si associano alle dimensioni ed a specifici profili patologici, suggerendo che la loro distinzione dal gruppo generico dei STM abbia utilità prognostica. La valutazione di altre tipologie di STM sarebbe auspicabile al fine di identificare specifici parametri prognostici per le singole entità neoplastiche.

**Parole chiave:** sarcomi dei tessuti molli, tumori perivascolari, grado, prognosi, profili patologici.

### PROGNOSTIC FACTORS IN CANINE PERIVASCULAR WALL TUMORS

Canine soft tissue sarcomas (STS) constitute 15% of subcutaneous tumors. In canine oncology STS are grouped as a single clinicopathological entity regardless of the specific histotype. The aim of this study was to compare the role of several prognostic variables in canine perivascular wall tumors (c-PWT) as a distinct group of STS. We evaluated tumor site and size, margins, depth of lesions, type of growth, necrosis, mitoses, MIB-1 based proliferation index (PI), grade and follow up in 56 c-PWT. Association among variables and their prognostic role were investigated statistically. Tumor size was significantly associated with relapse. Cases with clean margins did not recur. Depth was associated with relapse but had a low prediction capability. The association among tumor site, margins, depth, and type of growth identified pathological profiles associated with relapse. Grade, mitosis, PI and necrosis did not correlate with relapses. The lack of association between grade and relapses in c-PWT differs from STS as a group. C-PWT relapses are associated with size and specific pathological profiles suggesting that their distinction from STS is necessary for c-PWT prognosis. Evaluation of other STS types independently is recommended for the definition of prognostic parameters.

**Key words:** soft tissue sarcoma, perivascular wall tumors, grade, prognosis, pathological profiles.

## **ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLA CADHERINA-E NELLE PATOLOGIE ISTIOCITARIE CUTANEE DEL CANE**

**Magi Gian Enrico, Piermartini Martina, Rossi Giacomo, Renzoni Giacomo**

*Scuola di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Camerino*

La caderina-E è una molecola di adesione che partecipa alla costituzione delle giunzioni aderenti delle cellule epiteliali, inoltre viene espressa dalla cellule di Langerhans epidermiche. Molti studi hanno evidenziato che un'anomala espressione della caderina-E determina una diminuzione dell'adesione cellulare, evento implicato nella cancerogenesi, in particolare nella fase di invasione tumorale. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare, per via immunistochemica con valutazione semiquantitativa dell'immunomarcato, l'espressione della caderina-E nelle diverse patologie istiocitarie cutanee del cane: istiocitoma, istiocitosi reattiva e sarcoma istiocitario, al fine di valutare l'origine delle cellule proliferanti e di attribuire uno score di espressione. È stato utilizzato un anticorpo policlonale di coniglio anti caderina-E ottenuto da amminoacidi del dominio extracellulare della caderina-E di origine umana. Tutti gli 8 casi di istiocitomi considerati sono risultati positivi alla caderina E; 7 avevano uno score finale di espressione alto ed 1 aveva uno score intermedio. Tale risultato conferma l'origine a cellule di Langerhans dell'istiocitoma e la validità dell'anticorpo utilizzato. L'istiocitosi cutanea reattiva, considerata da vari autori come un processo infiammatorio reattivo caratterizzato dalla proliferazione delle cellule dendritiche dermiche, è risultata positiva alla caderina-E nel 54,5% dei casi studiati (6/11), ma l'83,3% di essi (5/6) aveva uno score di espressione basso. Nei casi diagnosticati come sarcoma istiocitario a localizzazione cutanea, neoplasia maligna ad elevata capacità di metastatizzazione, il 54,5% (6/11) dei campioni utilizzati in questo studio è risultato negativo all'espressione della caderina-E mentre per il restante 45,5% si è rilevata immunopositività (5/11); tra questi in 3 è emerso uno score basso e in 2 uno score alto. In conclusione, se negli istiocitomi i risultati concordano con quanto riportato in letteratura, l'identificazione di istiociti positivi alla caderina E nelle forme di istiocitosi reattiva e di sarcoma istiocitario a localizzazione cutanea rappresenta un risultato singolare poiché sia la forma reattiva che quella neoplastica in questione sono considerate originanti da cellule dendritiche dermiche.

**Parole chiave:** cane, istiociti, caderina-E, immunistochemica, cute.

### **E-CADHERIN IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION IN CANINE CUTANEOUS HISTIOCYTIC DISEASES**

Cadherins are a group of cell adhesion molecules. E-cadherin is expressed by epithelial cells and epidermal Langerhans cells. Altered expression of E-cadherin results in decreased adhesion of cells, an event implicated in tumorigenesis, particularly tumour cell invasion. The aim of this study was to evaluate by immunohistochemistry and by semi quantitatively analysis E-cadherin expression in canine histiocytic diseases: histiocytoma, reactive histiocytosis and histiocytic sarcoma in order to determine cell origin and to assign a score expression. For the study anti-E-cadherin rabbit polyclonal antibody raised against amino acids mapping an extracellular domain of E-cadherin of human was used. All histiocytoma cases (100%) expressed E-cadherin with high score expression, indicating a Langerhans cells origin. Reactive histiocytosis was positive for E-cadherin immunostaining in 54,5% of cases, of which 83,3% with low score expression. Histiocytic sarcoma was positive in the 45,5% of cases studied. Results obtained for histiocytoma are comparable with previous report whereas positive histiocytes observed in reactive histiocytosis and histiocytic sarcoma appear as a peculiar result because both entities are considered originating from dermal dendritic cells.

**Key words:** dog, histiocytes, E-cadherin, immunohistochemistry, skin.

## LESIONI GRANULOMATOSE SIMIL-TUMORALI CON ECCESSIVA MINERALIZZAZIONE IN STORIONI RUSSI (*Acipenser gueldenstaedtii*) AFFETTI DA MICOBATTERIOSI

Nuvoli Sara<sup>1\*</sup>, Prearo Marino<sup>2</sup>, Hetzel Udo<sup>3</sup>, Burrari Giovanni P.<sup>1</sup>, Giorgi Ilaria<sup>2</sup>, Pedron Claudio,<sup>2</sup> Foddai Gisella<sup>1</sup>, Sanna Marina A.<sup>1</sup>, Antuofermo Elisabetta<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione Patologia Generale e Anatomia Patologica, Università degli Studi di Sassari. <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino. <sup>3</sup>School of Veterinary Science, University of Liverpool, UK

In un gruppo di storioni russi (*Acipenser gueldenstaedtii*) provenienti da un allevamento del Nord Italia, sono state rilevate neoformazioni multiple, multinodulari, esofitiche, di dimensioni dai 2 ai 20 cm nella cute e nella cavità orale. L'esame necroscopico eseguito su 9 soggetti rilevava la presenza di 14 lesioni localizzate nel cavo orale nelle pinne caudali e pettorali. Nessun soggetto mostrava lesioni ai visceri. All'esame istologico, le neoformazioni apparivano scarsamente delimitate, con abbondante materiale granuloso positivo alla Von Kossa e associate ad un infiltrato infiammatorio costituito da macrofagi, cellule giganti, eterofili, rari linfociti e plasmacellule. Il quadro istologico osservato era compatibile con un severo infiltrato infiammatorio di tipo granulomatoso associato ad eccessiva mineralizzazione. Una lesione presentava alcune forme batteriche bastoncellari, extracellulari, positive alla Ziehl-Neelsen. L'esame batteriologico ha consentito di isolare *Mycobacterium chelonae*, un micobatterio non tubercolare, ubiquitario, saprofita che può causare nei pesci ulcere cutanee e granulomi negli organi interni. Questo lavoro rappresenta la prima segnalazione di lesioni granulomatose così estese negli storioni riferibili a *M. chelonae*. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per indagare sui micobatteri che causano granulomi associati ad eccessiva mineralizzazione o su patologie simil-tumorali come la calcinosis circumscripta.

**Parole chiave:** *Mycobacterium chelonae*, storione, calcinosi circumscripta.

## TUMOUR-LIKE GRANULOMATOUS INFLAMMATION WITH EXCESSIVE MINERALIZATION IN RUSSIAN STURGEONS (*Acipenser gueldenstaedtii*) INFECTED WITH MYCOBACTERIA

A group of Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*), was found with multiple, 2-20 cm diameter, firm exophytic masses in skin and oral cavity. Full necropsy was performed on 9 animals and a total of 14 lesions was examined. No visceral lesions were detected.

Histologically, all masses were poorly demarcated and characterized by a mild to severe deposition of necrotic cellular debris with extensive mineralisation, surrounded by an inflammatory infiltrate of macrophages, multinucleate giant cells, heterophils and some lymphocytes and plasma cells, leading to the diagnosis of a severe granulomatous-necrotising inflammation with excessive mineralisation. The Ziehl-Neelsen stain identified scarce rod-shaped, extracellular acid-fast bacteria in one lesion. Cultures from all granulomatous lesions yielded mycobacterial growth, and the bacteria were identified as *Mycobacterium chelonae*. In fish, it is known to cause skin ulcers and granulomas in internal organs. However, so far, there are no reports of such extensive multifocal granulomatous lesions in fish due to the agent. Also, the extent of dystrophic mineralisation is unusual, and the differentiation of the lesions as mycobacterial granuloma and a tumour-like calcinosis circumscripta will be discussed.

**Key words:** *Mycobacterium chelonae*, sturgeon, calcinosis circumscripta.

## VALORE PREDITTIVO DEGLI ESAMI CLINICO-LABORATORISTICI NELLA FIBROSI RENALE DEL CANE

Mezzalira Giorgia<sup>1,2</sup>, Aresu Luca<sup>1</sup>, Cavicchioli Laura<sup>1</sup>, Drigo Michele<sup>1</sup>, Caldin Marco<sup>2</sup>, Castagnaro Massimo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova. Legnaro (PD). <sup>1</sup>Clinica Veterinaria “San Marco”, Padova

La fibrosi renale è l'esito comune a molte lesioni renali che portano ad una progressiva insufficienza d'organo. In patologia umana, molti studi hanno evidenziato che sussiste una maggior correlazione tra la riduzione di funzionalità renale ed il danno tubulo-interstiziale, piuttosto che con la lesione glomerulare primaria. Lo scopo di questo lavoro è quello di trovare una correlazione predittiva tra il grado di fibrosi renale e diversi parametri clinici (creatinina, urea sierica, fosfato, osmolarità urinaria, peso specifico, escrezione urinaria di cloro, sodio ed urea). Per eseguire questo studio, sono stati selezionati 38 campioni di rene durante necrosopie di routine eseguite presso la Clinica Veterinaria “San Marco” di Padova, provenienti da altrettanti cani di razze molteplici, con gradi diversi di insufficienza renale. I criteri di inclusione nello studio comprendevano l'esame istologico accompagnato da analisi di laboratorio complete: esami ematologici e biochimici, analisi delle urine ed elettroforesi SDS-AGE. Sono state evidenziate correlazioni statisticamente positive tra fibrosi ed urea sierica, creatinina, PU/CU, osmolarità urinaria e tra escrezione urinaria di urea. Non sono state invece evidenziate in relazione al fosforo e peso specifico. E' stato inoltre possibile identificare un valore di cut-off del Pu/Cu che permette di riconoscere, con un buon grado di specificità e sensibilità, i soggetti con fibrosi lieve da quelli con fibrosi da moderata a grave. Inoltre si è potuto definire e sottolineare l'importanza di misurare l'osmolalità urinaria piuttosto che il peso specifico urinario. La fibrosi renale, infine, non presenta alcuna correlazione con il tipo di proteinuria, valutata con l'SDS-AGE.

**Parole chiave:** fibrosi, interstizio, rene, cane.

## PREDICTIVE VALUE OF LABORATORY AND CLINICAL EXAMINATIONS IN CANINE RENAL FIBROSIS

Renal fibrosis is the final common pathway for many kidney lesions that lead to chronic progressive organ failure. In human pathology many studies have demonstrated a much stronger association between the renal function and tubulo-interstitial damage (TID) than between renal function and glomerular lesions. This study is based on selected renal samples taken during routine necropsy examination from 38 dogs of multiple breeds with different grade of renal failure. The presence of complete laboratory analysis such as hemobiochemistry, urine analysis, SDS-AGE was a necessary condition to include dogs in the study. The aim of this work was to find predictive correlations between fibrosis grade and the different clinical parameters (creatinine, urea, phosphate, urine osmolality, specific gravity, urinary excretion of chloride, sodium and urea). Significant statistic correlations have been found between fibrosis and urea, creatinine, PU/Cu, urine osmolality and urinary excretion of urea, other correlations were not statistically significant, such as phosphate and specific gravity. Overall, it has been defined a Pu/Cu cut off value to differentiate dogs with mild fibrosis and subjects with moderate-severe fibrosis with a good sensitivity and specificity. In addition, the importance of use of urine osmolality instead of specific gravity has been underlined. Qualitative evaluation of proteinuria with SDS AGE didn't show any reliable correlation with the amount of fibrosis.

**Key words:** fibrosis, interstitium, kidney, dog.

## **BIOPSIE RENALI SERIALI IN CANI CON LEISHMANIOSI: STUDIO CLINICO-PATOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO**

**Benali Silvia<sup>1</sup>, Brovida Claudio<sup>2</sup>, Cavicchioli Laura<sup>1</sup>, Castagnaro Massimo<sup>1</sup>, Aresu Luca<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD).* <sup>2</sup>*Clinica Veterinaria Anubi, Moncalieri (TO)*

Nel cane, la leishmaniosi viscerale è frequentemente caratterizzata da coinvolgimento renale, spesso cronico ed irreversibile. Lo studio si è svolto su 14 cani *Leishmania*-positivi trattati con terapia specifica anti-*Leishmania* e sottoposti a duplice biopsia renale, pre-trattamento (T0) e post-trattamento (T1). Diversi parametri morfologici sono stati selezionati per classificare il grado di coinvolgimento glomerulare e tubulo-interstiziale (WSAVA). Il quadro renale in T0 e T1 è stato valutato sulla base del dato morfologico, dei dati di PU/CU e di proteinuria. Inoltre, si è effettuata analisi immunofenotipica per caratterizzare l'infiltrato infiammatorio (CD79 e CD3) e per studiare l'espressione di HLA-DR a livello delle cellule epiteliali tubulari (CET). In T0, le lesioni più frequenti sono state glomerulonefrite mesangio- e membranoproliferativa con flogosi e fibrosi tubulo-interstiziale di varia intensità. In T1, il quadro renale risultava invariato o aggravato nei cani con lesioni da moderate a gravi, mentre nei soggetti con lesioni glomerulari minime era osservabile una riduzione del grado di infiammazione tubulo-interstiziale. La tipologia di proteinuria era concorde al danno istologico evidenziato in tutti i casi. Alla microscopia elettronica si sono riscontrati fusione dei pedicelli, interposizione mesangiale ed immunodepositi. La terapia volta all'eliminazione dell'agente eziologico è apparsa rilevante nel ridurre il grado di infiammazione. L'immunoistochimica ha evidenziato un infiltrato B e T ed espressione di HLA sulle CET in associazione all'infiltrato. Questo dato fornisce nuovi spunti sul ruolo delle CET nel danno renale cronico.

**Parole chiave:** biopsia renale, cane, HLA-DR, *Leishmania*, proteinuria.

## **CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN SERIAL RENAL BIOPSIES: A CLINICO-PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY**

Canine visceral leishmaniasis causes frequently renal damage evolving in chronic kidney disease. Fourteen symptomatic serologically *Leishmania*-positive dogs were selected and biopsied before (T0) and after (T1) a specific anti-*Leishmania* pharmacological treatment. Different parameters were selected for evaluating the glomerular and the tubular-interstitial damage (WSAVA). To investigate renal function in T0 and T1, we associated the morphological changes with clinical data of proteinuria and Pu/Cu. An immunohistochemical analysis was performed to characterise the inflammatory infiltrate (CD3 and CD79) and to investigate the expression of HLA-DR in tubular epithelial cells (TECs). Mesangio- and membranoproliferative glomerulonephritis were the most frequent lesions observed with variable inflammation and fibrosis of the tubulo-interstitium. At T1, in moderate to severe affected dogs a progression of the disease was detected, while in mild affected dogs the interstitial inflammation was reduced. The most frequent ultrastructural changes were foot process effacement, thickening of basement membrane and immunodeposits. The type of proteinuria detected was in agreement with morphological findings. The therapy is able to eliminate the etiological agent and becomes relevant in reducing inflammation. CD3 and CD79 positive cells have been detected and expression of HLA in TEC was observed. This new data enhances the role of TECs in the chronic renal damage.

**Key words:** dog, HLA-DR, *Leishmania*, proteinuria, renal biopsy.

## SOTTOPOPOLAZIONI DI LINFOCITI T NELL'ENCEFALO DI CANI AFFETTI DA LEISHMANIOSI VISCERALE

**Melo Guilherme D., Schweigert Augusto, Fernandes Fernando V., Seraguci Túlio F., Machado Gisele F.**

*Dipartimento di Clinica, Chirurgia e Riproduzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, UNESP, Università Statale Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brasile*

La Leishmaniosi Viscerale (LV) è una antropozoonosi emergente causata da protozoi parassiti del complesso *Leishmania donovani*. I principali bersagli di questa malattia sono gli organi linfoidei e la pelle; tuttavia, sono segnalate anche alterazioni encefaliche, principalmente rappresentate da leptomeningite e coroidite. La *Leishmania* è in grado di interferire con la risposta immunitaria dell'ospite, inducendo l'attivazione della risposta Th1 o Th2, a suo proprio vantaggio. All'interno dell'encefalo, quando è in corso la LV, la popolazione cellulare principale è composta da linfociti T, ma ulteriori dati non sono disponibili. Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare i linfociti T dell'encefalo nelle sottopopolazioni CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, per mezzo di immunistochimica, nelle leptomeningi corticali, plesso coroide e zona subependimale in dieci cani con LV e in dieci cani sani. Grandi quantità di linfociti T CD3<sup>+</sup> sono state rilevate nell'encefalo di cani con LV, in divergenza con le rare cellule trovate nei cani sani, probabilmente, in quest'ultimo caso, collegate all'immunosorveglianza fisiologica. Poche cellule CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> sono state trovate fra le cellule mononucleate degli infiltrati. Anche se i linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> sono importanti per la risposta immunitaria periferica, queste cellule sembrano non essere collegate con la neuropatogenesi della LV. I linfociti T CD3<sup>+</sup> presenti nell'encefalo potrebbero essere collegati a un'altra sottopopolazione cellulare, caratterizzata dal fenotipo CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (doppio negativo), come precedentemente riscontrato in casi di leishmaniosi cutanea umana.

**Parole chiave:** barriera emato-encefalica, CD3, linfocita doppio negativo, neuropatologia, risposta immune.

### T CELL SUBSETS IN THE BRAIN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

Visceral leishmaniasis (VL) is an emerging anthrozoosis caused by parasitic protozoans of the *Leishmania donovani* complex. The main target of this disease is the lymphoid organs and the skin; nevertheless, evidences of brain alterations are reported, mainly represented by leptomeningitis and choroiditis. *Leishmania* is able to interfere with the host's immune response, driving to the activation of the Th1 or Th2 response, on its own benefit. During VL, within the brain, the main cell population is composed of T lymphocytes, but no further data is available. The aim of this study was to characterize the T lymphocytes in the brain into the CD4 and CD8 subsets, by means of immunohistochemistry, in the cortical leptomeninges, choroid plexi and subependymal area in ten dogs with VL and in ten healthy dogs. High amounts of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes were detected in the brain of dogs with VL, in contrast with the rare cells found in the control dogs, possibly, in the latter case, related to physiological immunosurveillance. Few CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells were found among the mononuclear cells infiltrate. Although CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are linked to the peripheral immune response, these cells seem not to be related in the neuropathogenesis of VL. The CD3<sup>+</sup> T lymphocytes presented in the brain might be related to another cell subset, represented by CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (double negative) phenotype, as already reported in human cutaneous leishmaniasis.

**Key words:** blood-brain barrier, CD3, double negative lymphocyte, immune response, neuropathology.

## ESPRESSIONE DEI RECETTORI PER I CANNABINOIDI DI TIPO 1 E 2 NELLA CUTE DI CANE SANO E AFFETTO DA DERMATITE ATOPICA

**Campana Luca<sup>°</sup>, Miragliotta Vincenzo<sup>°</sup>, Ricci Emanuele<sup>°</sup>, Cristino Liugia\*, Di Marzo Vincenzo\*, Albanese Francesco<sup>§</sup>, della Valle Maria Federica<sup>#</sup>, Abramo Francesca<sup>°</sup>**

*<sup>°</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università di Pisa.*

*\*Istituto di Chimica Biomolecolare, C.N.R., Pozzuoli (NA). <sup>§</sup>Libero Professionista, Clinica Veterinaria L'Arca, Napoli. <sup>#</sup>Centro di Documentazione ed Informazione Scientifica (CeDIS), Innovet Italia srl, Saccolongo (PD)*

Negli ultimi anni, il sistema endocannabinoide ha ricevuto un crescente interesse, in funzione degli effetti protettivi che gli sono stati riconosciuti, in corso di in numerosi disordini degenerativi ed allergico-infiammatori. Recenti studi effettuati sia nell'uomo che nell'animale sperimentale hanno evidenziato la presenza dei recettori per i cannabinoidi di tipo 1 e 2 (CB1, CB2) in molti tessuti, fra cui il sistema nervoso, il sistema immunitario e la cute. Scopo del presente studio è quello di determinare la distribuzione dei recettori CB1 e CB2 nella cute di cane sano e affetto da dermatite atopica (DA). Le indagini di immunohistochemical sono state eseguite su sezioni di cute, cervello (controllo positivo per CB1) e linfonodo (controllo positivo per CB2) di 5 cani sani e su sezioni di cute di 5 cani con DA. Nella cute di cane sano, così come in quella dei cani con DA, è stata osservata immunoreattività sia al CB1 sia al CB2 a livello di: epidermide, follicoli piliferi, ghiandole sebacee e sudoripare, cellule dermiche perivascolari con tipica morfologia mastocitaria, fibroblasti ed endotelioцитi. L'epidermide, le ghiandole sebacee iperplastiche e gli endotelioцитi reattivi dei soggetti con DA mostravano una maggior espressione di entrambi i recettori. La componente infiammatoria perivascolare presente nella cute dei cani con DA è risultata positiva al CB2. È stata osservata intensa immunoreattività al CB1 e al CB2, rispettivamente nell'ippocampo e nelle aree follicolari linfonodali. I risultati del presente studio approfondiscono le conoscenze in merito al sistema endocannabinoide nella specie canina, un sistema che potrebbe rappresentare un promettente target farmacologico per il trattamento di disordini immuno-infiammatori del cane.

**Parole chiave:** dermatite atopica, recettori dei cannabinoidi, endocannabinoidi, cute, cane.

## CANNABINOID RECEPTOR TYPE 1 AND 2 IN NORMAL CANINE SKIN AND SKIN OF DOGS WITH ATOPIC DERMATITIS

The endocannabinoid system is receiving increased attention in recent years for its protective role in several degenerative and allergic inflammatory disorders. Studies on human and laboratory animals have recently shown the occurrence of cannabinoid receptors type 1 and 2 (CB1, CB2) in the nervous and immune systems and the skin. The aim of the present study is to determine the CB1 and CB2 distribution in canine skin of normal dogs and dogs with atopic dermatitis (AD). Immunohistochemical investigation was performed on skin, brain tissue (CB1 positive control) and lymph node (CB2 positive control) from 5 healthy dogs and skin from 5 dogs with AD. CB 1 and CB2 skin immunoreactivity was found in the epidermis, hair follicles, sweat and sebaceous glands, perivascular cells showing typical mast cell morphology, fibroblasts and endothelial cells of skin from healthy dogs and dogs with AD. In AD dogs, the hyperplastic epidermis, sebaceous glands and the reactive endotheliocytes showed strong CB1 and CB2 immunoreactivity. The perivascular inflammatory infiltrate observed in dogs with AD showed CB2 immunoreactivity, as well. CB1 immunoreactivity in the brain was observed in various hippocampal structures, while CB2 was found in the follicular B cell area of lymph nodes. The present findings extend our knowledge of the endocannabinoid system in the canine species, which might represent a novel pharmacological target for the treatment of immune-inflammatory disorders in dogs.

**Key words:** atopic dermatitis, cannabinoid receptors, endocannabinoids, skin, dog.

## **APPLICAZIONE DI LECTINE SU *SACCOLUS ROTUNDUS* DI CONIGLI NATURALMENTE INFETTI PER UNO STUDIO SULLE CELLULE M**

**Poppi Lisa, Luban Giacomo, Cristaudo Ilaria, Terreran Anna, Castagnaro Massimo**

*Dipartimento Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria*

Tra le cellule del *Follicle-Associated Epithelium* (FAE), le cellule M arrivano a rappresentare nel coniglio il 50% della popolazione. Avendo il compito di catturare macromolecole, microrganismi e particelle e di trasportarle ai sottostanti linfociti, sono state studiate in conigli naturalmente infetti mediante lectine, al fine di osservarne le alterazioni a livello di glicoconiugati di superficie quando attivate. Con la collaborazione della sezione Diagnostica dell'IZSVE della sezione di Treviso (necropsie e successive analisi microbiologiche di routine sul contenuto ciecale, compresa biotipizzazione di *E. coli*), sono stati raccolti campioni di *sacculus rotundus* da 98 soggetti di entrambi i sessi, di età compresa tra i 45 e i 60 giorni, moribondi o morti da poco e con sintomi o lesioni da patologie enteriche; tutti i soggetti provenivano da allevamenti di tipo industriale. E' stato applicato un pannello di 17 lectine, delle quali 7 si sono rivelate non utili (BS II, Con A, ECL, Jacalin, LTL, PNA, SBA) e le restanti si sono suddivise in 2 principali gruppi: marcanti i linfociti (BSI-B4, WGA, PHA-E) e marcanti diverse parti delle cellule M (LCA, DBA, PSA, UEA-I); un terzo piccolo gruppo marcava principalmente i vasi sanguigni (MAL II, SNA, GNL). Differenze sostanziali nella marcatura si sono avute anche in lesioni indotte da diversi batteri, suddivisi in *E. coli* e non-*E. coli* (*Clostridium* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., associazioni di questi). Pur tenendo presente l'estrema variabilità delle cellule M nelle diverse sezioni di intestino e la difficoltà di reperire campioni ottimali da conigli naturalmente infetti, i risultati del presente lavoro pongono importanti basi per successivi studi e aprono nuove interessanti domande.

**Parole chiave:** cellule M, lectine, coniglio, infezione naturale, *sacculus rotundus*.

## **LECTINS APPLICATION ON NATURALLY INFECTED RABBITS *SACCOLUS ROTUNDUS* TO STUDY M CELLS**

M cells represent up to 50% of total Follicle-Associated Epithelium (FAE) cells in the rabbit intestine. Due to the role of M cells in transporting macromolecules, microorganisms and particles to the underlying lymphocytes, they were studied with lectins in naturally infected rabbits to observe, once activated, surface glycoconjugate alterations. In cooperation with Treviso's Diagnostic section of IZSVE (necropsies and successive routinary microbiological analysis on cecal contents, with *E. coli* biotipization), samples of *sacculus rotundus* were collected from 98 animals (male and female), 45-60 days old, dying or not long dead, with enteric disease symptoms or lesions; all the animals were sourced from intensive breeding farms. A panel of 17 lectins was applied: 7 lectins were scrapped as non marking (BS II, Con A, ECL, Jacalin, LTL, PNA, SBA), and the other lectins subdivided in 2 main groups: lymphocytes-marking (BSI-B4, WGA, PHA-E) and different parts of M cells-marking (LCA, DBA, PSA, UEA-I); a third small group of lectins marked mainly blood vessels (MAL II, SNA, GNL). Significant differences were found in lesions caused by different bacteria, subdivided in *E. coli* and non-*E. coli* (*Clostridium* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., mix of them). In spite of the extreme variability of M cells in the different intestinal areas, and the difficulty in obtaining fresh samples from naturally infected rabbits, the results of this study may be useful in future research, and pose further interesting questions.

**Key words:** M cells, lectins, rabbit, natural infection, *sacculus rotundus*.

## UN CASO DI LEYDIGOMA TESTICOLARE NEL GATTO

**Asproni Pietro, Millanta Francesca, Bertolini Elisabetta<sup>o</sup>, Poli Alessandro**

*Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa.  
Ambulatorio Veterinario Associato Bertolini Rossi Mannucci, Pontedera (PI)*

I tumori testicolari sono estremamente infrequenti nel gatto. Sono segnalati, prevalentemente, rari casi di sertolioma, seminoma maligno e leydigoma ectopico. Lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere un caso di leydigoma testicolare in un gatto europeo di 13 anni. Alla visita clinica il soggetto presentava il testicolo destro aumentato in volume e consistenza, con il controlaterale ipotrofico. In seguito alla castrazione i due testicoli sono stati processati e colorati secondo le normali metodiche per la diagnosi istopatologica. Ulteriori sezioni sono state sottoposte ad analisi immunoistochimiche con anticorpi anti pan-Citocheratine, Vimentina e Melan-A. L'indagine istologica del testicolo ipertrofico ha messo in rilievo una disarchitettura del parenchima per la presenza di una neoplasia nodulare costituita da cellule dal nucleo piccolo, tondo e basofilo e dall'ampio citoplasma eosinofilo e vacuolizzato. Le cellule erano organizzate in strutture acinari e foglietti delimitati da tessuto connettivo. Sulla base di tali caratteristiche è stata emessa diagnosi di leydigoma. Le analisi immunoistochimiche hanno svelato una positività delle cellule tumorali verso l'anticorpo anti-Vimentina e anti-Melan-A, e nessuna immunoreattività verso l'anticorpo anti pan-Citocheratine. È stato finora segnalato un unico caso di leydigoma testicolare felino, associato a sertolioma; negli altri rari casi la localizzazione era in sedi ectopiche. Questo è dunque il primo leydigoma testicolare felino senza altri coesistenti tumori. L'indagine immunoistochimica ha fornito risultati sovrapponibili a quelli presenti in letteratura. Alla luce di quanto riportato, il leydigoma può essere inserito nella diagnosi differenziale delle patologie testicolari feline.

**Parole chiave:** gatto, testis, leydigoma, immunoistochimica.

### A CASE OF TESTICULAR LEYDIG CELL TUMOR IN A CAT

Testicular tumors are very uncommon in cats, where few cases of sertolioma, malignant seminoma and ectopic Leydig cell tumor are reported. The aim of this study is to describe a case of testicular Leydig cell tumor in a 13 years old European Shorthair cat. At the clinical examination the cat showed an increased volume and firmness of the right testis, while the left one was atrophic. After castration the two testes were submitted to histology following routine procedures. Additional sections were used for an immunohistochemical analysis with antibodies against pan-Cytokeratin, Vimentin and Melan-A. The hypertrophic testis showed a nodular neoplasm formed by small, round and dark nuclei and large, eosinophilic and vacuolated cytoplasm. These cells were arranged in acinar structures and solid sheets. Considering these features, the neoplasm was diagnosed as Leydig cell tumor. IHC analysis showed that tumor cells were positive for anti-Vimentin and anti-Melan-A antibodies. No immunoreactivity to anti-pan-Cytokeratin was observed. Only one case of feline Leydig cell tumor has been, until now, reported in literature, even though associated to a sertolioma. In the other rare cases Leydig cell tumors were localized in ectopic tissue. This case is thus, to best of our knowledge, the first feline Leydig cell tumor without any concurrent neoplasm. Immunohistochemical results are in agreement with previous findings in literature. Considering what we reported, Leydig cell tumor may be included in the differential diagnosis of feline testicular pathologies.

**Key words:** cat, testis, Leydig cell tumor, immunohistochemistry.

## UN CASO DI SEMINOMA METASTATIZZANTE IN UN CONIGLIO DA COMPAGNIA

**Banco Barbara, Stefanello Damiano\*, Giudice Chiara, D'Acerno Massimo\*\*, Cotti Cometti Sara, Di Giancamillo Mauro\*, Grieco Valeria**

*Dipartimento di Patologia Animale. Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare. \*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano. \*\* Libero professionista*

Nel coniglio i seminomi sono segnalati fin dal 1918. Gli autori di questo primo lavoro riuscirono a trapiantare sperimentalmente un seminoma da un coniglio all'altro e ad ottenere, in quest'ultimo una forma, metastatizzante. Nel presente studio si descrive un caso di seminoma spontaneamente metastatizzante in un pet rabbit di razza testa di leone dell'età di 9 anni. Tale coniglio manifestava l'aumento di volume di uno dei 2 testicoli nonché, all'esame tomografico, la presenza di una massa addomino-pelvica nell'area di pertinenza dei linfonodi lombo-aortici. Testicoli e linfonodi sono stati asportati chirurgicamente, fissati in formalina e sottoposti ad esame istologico. Il testicolo aumentato di volume ed i linfonodi regionali risultavano totalmente invasi da un seminoma diffuso, mentre nell'altro testicolo, che presentava atrofia della linea seminale, era presente un piccolo adenoma interstiziale.

Questa è al prima segnalazione di un seminoma spontaneamente metastatizzante nel coniglio. I seminomi sono sempre più frequenti in medicina umana, in particolare le forme definite "classiche" che, contrariamente a quelle spermatocitiche, danno origine a metastasi. Da tempo si è alla ricerca di una specie animale che possa rappresentare un buon modello animale per lo studio di queste patologie. Il ratto non si è dimostrato specie idonea soprattutto per la breve aspettativa di vita e per la bassissima incidenza di tumori testicolari.. Nel presente lavoro si descrive un seminoma metastatizzante morfologicamente e dal comportamento biologico assai simile alle forme umane. Tali osservazioni suggeriscono che il coniglio potrebbe rappresentare un buon modello animale per lo studio dei seminomi umani e incoraggiano a continuare le ricerche.

**Parole chiave:** coniglio, testicolo, seminoma metastatizzante.

### A CASE OF METASTASIZING SEMINOMA IN A PET RABBIT

In veterinary literature only one case of metastasizing seminoma is described in the rabbit (1918). The lesion was experimentally induced by inoculation of neoplastic cells, collected from a seminoma spontaneously occurred in a rabbit, into the seminiferous tubules of a recipient rabbit. In the present study, a case of a spontaneous metastasizing seminoma in a 9 years-old, lionhead, pet rabbit is described. The rabbit was presented with monolateral testicular enlargement. Tomography revealed the presence of an abdominal-pelvic mass consistent with paraaortic lymph nodes. Testes and lymph nodes were excised, formalin fixed and histologically examined. Enlarged testis and lymph-nodes were completely substituted by a diffuse neoplastic growth consistent with seminoma. In the contralateral testis, atrophy of the seminiferous tubules and a small interstitial cell adenoma were observed.

In the last decades the incidence of human testicular cancer, in particular classical metastasizing seminoma, has dramatically increased. A selection of appropriate animal models and experimental designs might contribute to enhance understanding the pathogenesis of testicular cancer and to improve therapeutic strategies. Due to their *shorter life* expectancy and rare incidence of testicular neoplasia, rats are not considered a good animal model for the study of human seminomas. This is the first report of a spontaneously metastasizing seminoma in a rabbit. Cellular morphology, phenotype and biological behavior are similar to the human counterpart. These results illustrate the potential relevance of the rabbit as a model for the study of human seminoma.

**Key words:** rabbit, testis, metastasizing seminoma.

## ESPRESSIONE DELLA B-CATENINA E DELLA SURVIVINA NEI TUMORI DEI NERVI PERIFERICI DEL CANE

**Bongiovanni Laura<sup>1</sup>, Romanucci Mariarita<sup>1</sup>, Liberatori Silvia<sup>1</sup>, Oevermann Anna<sup>2</sup>, Malatesta Daniela<sup>1</sup>, Della Salda Leonardo<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo. <sup>2</sup>Neurocenter, Division of Experimental Clinical Research, University of Bern, Bern, Switzerland*

Una sovraespressione della survivina è stata osservata nei tumori dei nervi periferici dell'uomo, sia nelle forme benigne (BPNSTs) che maligne (MPNSTs). La  $\beta$ -catenina, proteina fondamentale per lo sviluppo e il mantenimento delle cellule di Schwann normali, risulta essere espressa nei BPNSTs, mentre non ci sono dati sulla sua espressione nelle forme maligne.

Vista la mancanza di dati riguardo l'espressione di tali molecole nel sistema nervoso periferico del cane, scopo del presente lavoro è stato quello di valutarne l'espressione e la localizzazione, attraverso metodica immunistochemica, in 4 BPNSTs, 15 MPNSTs e nervi periferici normali di cane. I risultati sono stati analizzati con metodo semiquantitativo.

Nel tessuto normale, sono stati osservati bassi livelli di espressione della survivina, mentre la  $\beta$ -catenina mostrava un'intensa positività di membrana nelle cellule di Schwann. Nei PNSTs, è stato osservato un aumento dell'espressione della survivina all'aumentare della malignità. L'espressione membranosa della  $\beta$ -catenina è apparsa preservata in maniera incostante nelle forme benigne, con una riduzione di espressione in quelle maligne, dove si osservavano positività citoplasmatiche e nucleari.

Il presente studio mette in evidenza differenti livelli di espressione delle molecole in esame nei nervi periferici normali, BPNSTs e MPNSTs. Inoltre, l'espressione della survivina in tutti i campioni neoplastici analizzati suggerisce che tale molecola potrebbe rappresentare un potenziale target terapeutico per la terapia dei PNSTs del cane, come recentemente ipotizzato per gli stessi tumori dell'uomo.

**Parole chiave:** tumori dei nervi periferici, cane, survivina,  $\beta$ -catenina.

### **B-CATENIN AND SURVIVIN EXPRESSION IN CANINE PERIPHERAL NERVE SHEATH TUMOURS**

Survivin overexpression has been detected in both benign (BPNSTs) and malignant human peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs). Expression of  $\beta$ -catenin, a key molecule in Schwann cell development and maintenance, has been demonstrated to be preserved in human BPNSTs. Since no data are available about expression of these molecules in the peripheral nervous system of the dog, the aim of this study was to evaluate their expression in canine peripheral nerves and PNSTs, in order to investigate their potential prognostic and/or therapeutic value in this species.

Immunohistochemical expression and localization of survivin and  $\beta$ -catenin were evaluated in 4 benign PNSTs, 15 malignant PNSTs and normal peripheral nerves of canine species. A semi-quantitative method was used for the analysis of the results.

In normal tissue, a low expression of survivin was observed, while  $\beta$ -catenin showed an intense membrane expression in Schwann cells. In PNSTs, survivin expression increased with malignancy. Membrane  $\beta$ -catenin expression was multifocally preserved in BPNSTs, but reduced in MPNSTs, where nuclear and cytoplasmic immunostaining were found.

These results demonstrate different expression patterns of survivin and  $\beta$ -catenin in normal tissue, BPNSTs and MPNSTs. Survivin overexpression was detected in all tumour cases suggesting that this protein can represent a potential molecular target for the therapy of canine PNSTs, as it has been recently hypothesized for the human counterpart.

**Key words:** peripheral nerve sheath tumour, dog, survivin,  $\beta$ -catenin.

## **EFFETTI DELLA STABULAZIONE SULL'ESPRESSIONE GENICA DELLE CITOCHINE NEI VITELLONI PIEMONTESI**

**Cannizzo Francesca Tiziana, Starvaggi Cucuzza Laura, Divari Sara, Bellino Claudio, D'Angelo Antonio, Biolatti Bartolomeo**

*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino*

Il vitellone Piemontese rappresenta una tra le più importanti razze da carne italiane tradizionalmente allevato a stabulazione fissa durante il periodo dell'ingrasso. Le recenti linee guida europee (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare) relative al benessere animale vietano questo tipo di stabulazione a favore di quella libera. Il presente studio si proponeva di valutare eventuali differenze nell'espressione genica di alcune citochine prodotte dai linfociti in animali stabulati nelle due modalità. Sono stati quindi presi in esame 20 bovini maschi di razza Piemontese, di età compresa tra 9-13 mesi, provenienti da due allevamenti differenti (A e B). In ciascuna stalla i 10 animali sono stati suddivisi in due diversi gruppi di stabulazione (posta fissa vs liberi in box). Da tutti i soggetti è stato prelevato il sangue una volta al mese per 4 volte (T1, T2, T3, T4) e i linfociti sono stati separati su gradiente di Ficoll. Si è proceduto all'estrazione dell'mRNA mediante protocollo Trizol e successivamente è stata valutata con real time PCR l'espressione genica di IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL2RA, IL4, IL6, IL8 e TNF- $\alpha$ . È stata osservata una variazione significativa nell'espressione di IFN- $\gamma$ , IL2RA e IL8 in tutti i gruppi di animali nel periodo considerato. Inoltre, l'espressione di IFN- $\gamma$  e IL8 variava significativamente tra le stalle a parità di condizione di stabulazione. In nessun caso sono state riscontrate differenze tra i soggetti a posta fissa e quelli liberi in box. L'IL4 mostrava una variazione significativa nel tempo solo in una delle due stalle nei soggetti in box. Al contrario, IL1 $\beta$ , IL6 e TNF- $\alpha$  non presentavano differenze significative in nessuna delle condizioni prese in esame. Pertanto, i risultati ottenuti non rilevano differenze imputabili al tipo di stabulazione, ma evidenziano piuttosto la suscettibilità degli animali agli stimoli ambientali e alla gestione aziendale.

**Parole chiave:** vitelloni, citochine, real time PCR, stabulazione.

## INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni l'Unione Europea ha varato una serie di norme relative al benessere degli animali di interesse zootecnico (Direttiva 98/58/CE). Inoltre, le aspettative di produttori e consumatori hanno aumentato l'attenzione sulle condizioni di allevamento del bovino. La Piemontese è la razza bovina italiana da carne più rappresentata sul territorio nazionale e tradizionalmente il vitellone, nel periodo dell'ingrasso, viene stabulato alla posta fissa. Poiché il fattore stabulazione si è dimostrato capace di influenzare lo stress (1), e di conseguenza la risposta produttiva degli animali, le recenti linee guida della Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare relative al benessere animale vietano questo tipo di stabulazione a favore di quella libera. Tra i vari parametri considerati per la valutazione dello stress, i linfociti circolanti sono un indicatore sensibile delle risposte fisiopatologiche e possono essere quindi usati per definire stati di malattia nel bovino (2). Alterazioni della formula leucocitaria sono state documentate nei bovini da carne in diversi tipi di stabulazione (3). Condizioni di stress prolungato possono influire negativamente sull'efficienza del sistema immunitario, traducendosi in una maggiore suscettibilità dell'animale ad ammalarsi (4). A tal proposito, cambiamenti nella produzione delle citochine, coinvolte principalmente nella risposta immunitaria contro patogeni e nei processi infiammatori, possono essere utilizzati come indicatori di stati patologici indotti da stress. Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto valutare eventuali differenze nell'espressione genica di alcune citochine prodotte dai linfociti di animali stabulati secondo le due modalità.

## MATERIALI E METODI

### Animali

Sono stati presi in esame 20 vitelloni maschi, di razza Piemontese, di età compresa tra i 9 e i 13 mesi, clinicamente sani, provenienti da due allevamenti (A e B). In ciascuna stalla i 10 animali sono stati suddivisi in modo casuale in due gruppi di stabulazione (posta fissa vs liberi in box).

### Campioni

Da ciascun soggetto è stato effettuato un prelievo di sangue dalla vena giugulare mediante provetta Vacutainer® un volta al mese per 4 volte (T1, T2,

T3 T4). I linfociti sono stati separati su gradiente di Ficoll-Paque™ (750 rcf a 20°C per 30'), successivamente addizionati con 750 µl di QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen) e stoccati a -80°C fino al momento dell'estrazione.

### Espressione genica

I linfociti sono stati dismembrati tramite il TissueLyser II (Qiagen) per mezzo di biglie di acciaio. La concentrazione dell'RNA è stata determinata tramite spettrofotometro e l'integrità è stata valutata mediante elettroforesi capillare (Experion™ Instrument, Bio-Rad). Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale mediante il QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. L'espressione genica relativa di IFN-γ, IL1β, IL2RA, IL4, IL6, IL8, TNF-α è stata determinata tramite real-time PCR usando il metodo Syber® Green e il sistema di rilevamento IQ™5 (Bio-Rad). Le sequenze dei primer sono state disegnate usando Primer Express® (vers. 1.5; Applied Biosystems) (Tabella 1). La ciclofillina A è stata usata come gene housekeeping, come precedentemente riportato (5). Le espressioni geniche sono riferite a un calibratore (cui è assegnato un valore pari a 1).

### Statistica

Tutti i dati ottenuti sono stati espressi come valori medi ± DS e sono stati analizzati mediante software GraphPad InStat (vers. 3.05). Tutti i valori con  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

È stata osservata una variazione significativa nell'espressione di IFN-γ, IL2RA e IL8 in tutti i gruppi di animali nel periodo considerato (Figura 1). In particolare, al T3 si è registrato un aumento significativo nella produzione di IFN-γ e IL8, mentre l'IL4 ha mostrato una variazione significativa nel tempo solo nei soggetti in box nella stalla B (Figura 1). Inoltre, l'espressione di IFN-γ e IL8 variava significativamente tra le stalle a parità di condizione di stabulazione (Figure 2 e 3). L'espressione di IL2RA ha mostrato una diminuzione nel tempo, anche se non sempre significativa. Al contrario, IL1β, IL6 e TNF-α non hanno presentato differenze significative in nessuna delle condizioni prese in esame (Tabella 2). In nessun caso sono state riscontrate differenze tra i soggetti a posta fissa e quelli liberi in box.

## DISCUSSIONE

Sebbene il modello di stabulazione sia un elemento noto di stress nell'allevamento del bovino (6), i nostri risultati non mostrano differenze significative tra i oggetti stabulati in box e quelli stabulati alla catena, confermando che la risposta allo stress è influenzata da numerosi fattori. L'incremento significativo nell'espressione di IFN- $\gamma$  e IL8, appartenenti al gruppo delle citochine pro-infiammatorie (7), si verifica al T3 in entrambi i gruppi di stabulazione, suggerendo per tale variazione una probabile causa ambientale. D'altra parte, una contemporanea diminuzione significativa della sintesi dell'IL4, citochina anti-infiammatoria (7), si registra al T3 solo nei soggetti allevati in box nell'allevamento B, a ulteriore conferma che la risposta allo stress è complessa. Sebbene la diminuzione nell'espressione di IL2RA non sia un segnale diretto di abbassamento delle difese immunitarie, è noto che metaboliti associati allo stress, come il cortisolo, possono influenzare la proliferazione o il differenziamento delle cellule del sistema immunitario (8).

## CONCLUSIONE

Pertanto, i risultati ottenuti non rilevano differenze imputabili al tipo di stabulazione, ma

evidenziano piuttosto la suscettibilità degli animali agli stimoli ambientali e alla gestione aziendale.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Gupta *et al.* Vet. J. 2007, 173: 605–616.
- 2) Jones e Allison. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 2007, 23: 377-402.
- 3) Gupta *et al.* Vet. J. 2007, 173: 594-604.
- 4) Carroll e Forsberg. Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. 2007, 23: 105-149.
- 5) De Maria *et al.* Vet. Rec. 2010, 167: 291-296.
- 6) Rushen *et al.* J. Anim. Sci. 1999, 77: 2918–2924.
- 7) Dinarello. Chest. 2000, 118: 503-508.
- 8) Kim *et al.* J. Vet. Sci. 2011, 12: 151-157.

## RINGRAZIAMENTI

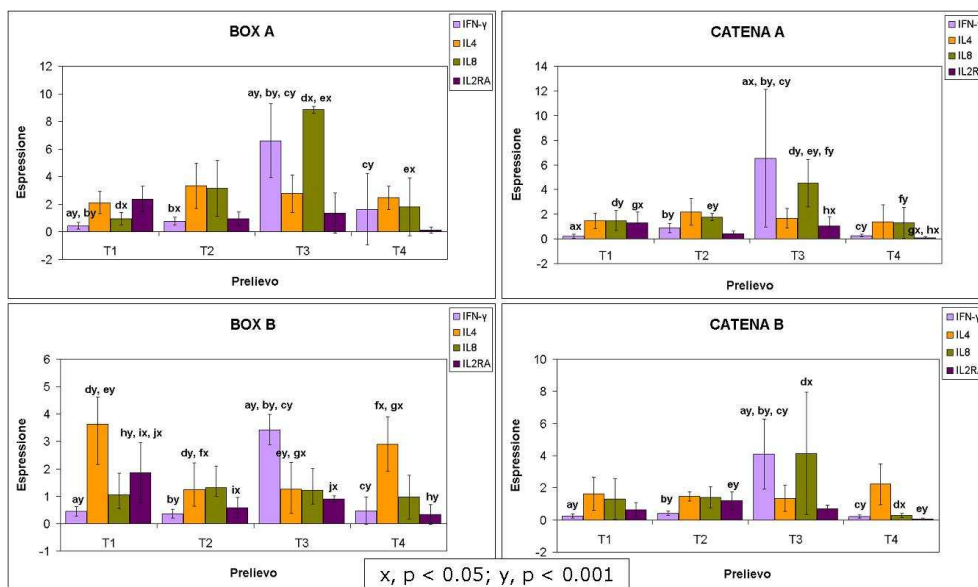
*Progetto finanziato dalla Regione Piemonte, Direzione Sviluppo dell'Agricoltura dal titolo: "Correlazioni tra qualità della carne, benessere e sanità animale negli allevamenti piemontesi". Gli autori ringraziano il Centro di Referenza Bruno Maria Zaini, Torino.*

Gene	Senso	Sequenze 5' → 3'	Amplificone (bp)	GeneBank accession number
IFN- $\gamma$	Fw	TGTGGGCTTTTGGGTTTTTC	100	NM_174086
	Rev	GCTACATCTGGGCTACTTGCATAA		
IL1 $\beta$	Fw	CTCCACCTCCTCTCACAGGAAA	100	NM_174093
	Rev	TACCCAAGGCCACAGGAATC		
IL4	Fw	CGGACTTGACAGGAATCTCA	108	NM_173921
	Rev	ATCGTCTTTAGCCTTTCCAAGA		
IL6	Fw	TCAAAAATGACACCACCCCA	151	NM_173923
	Rev	GCCAGTGTCTCCTTGCTGCT		
IL8	Fw	AGAGTGGGCCACACTGTGAAA	101	NM_173925
	Rev	CACAACCTTCTGCACCCACTT		
IL2RA	Fw	AGCTTGCTGATGTGGAGGTT	102	NM_174358
	Rev	CTTGAACATGGCGTTTCTGA		
TNF- $\alpha$	Fw	TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGC	103	NM_173966
	Rev	CCATGAGGGCATTGGCATAAC		
Ciclofillina A	Fw	GCCCAACACAAATGGTT	95	NM_178320
	Rev	CCCTCTTTCACCTTGCCAAAG		

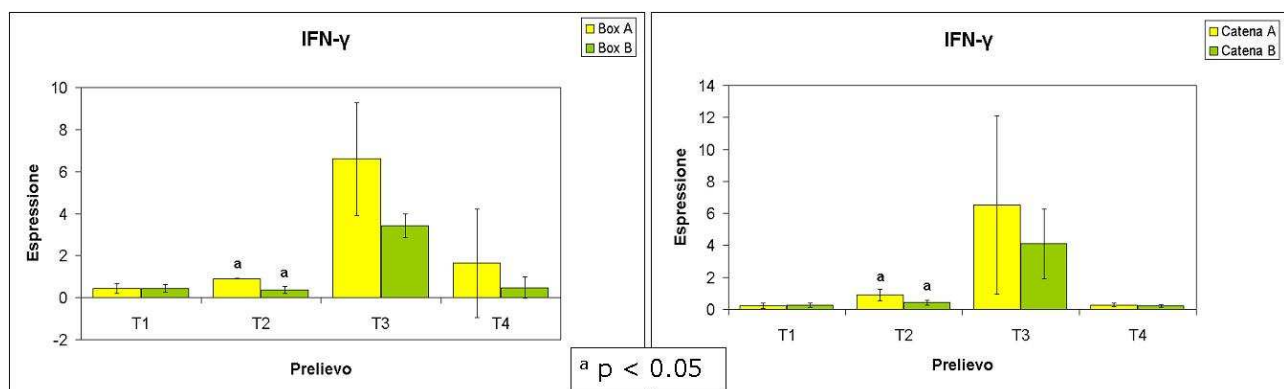
**Tabella 1** - Sequenze dei primer usati in real-time PCR.

			T2	T3	T4
IL1 $\beta$	BOX A	0.04 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.13	0.04 $\pm$ 0.08
	CATENA A	0.03 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.05
	BOX B	0.18 $\pm$ 0.27	0.18 $\pm$ 0.28	0.05 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.04
	CATENA B	0.17 $\pm$ 0.29	0.17 $\pm$ 0.29	0.18 $\pm$ 0.13	0.12 $\pm$ 0.18
IL6	BOX A	1.17 $\pm$ 0.33	0.29 $\pm$ 0.62	1.21 $\pm$ 3.02	0.52 $\pm$ 1.94
	CATENA A	0.10 $\pm$ 0.10	0.20 $\pm$ 0.19	0.10 $\pm$ 0.24	0.07 $\pm$ 0.11
	BOX B	0.22 $\pm$ 0.71	0.04 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.25	0.10 $\pm$ 0.14
	CATENA B	0.16 $\pm$ 0.37	0.09 $\pm$ 0.11	0.32 $\pm$ 0.71	0.13 $\pm$ 0.40
TNF- $\alpha$	BOX A	0.11 $\pm$ 0.12	0.13 $\pm$ 0.11	0.12 $\pm$ 0.16	0.04 $\pm$ 0.16
	CATENA A	0.08 $\pm$ 0.09	0.09 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.13	0.009 $\pm$ 0.016
	BOX B	0.22 $\pm$ 0.74	0.04 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.03	0.007 $\pm$ 0.019
	CATENA B	0.30 $\pm$ 0.37	0.15 $\pm$ 0.14	0.11 $\pm$ 0.13	0.003 $\pm$ 0.006

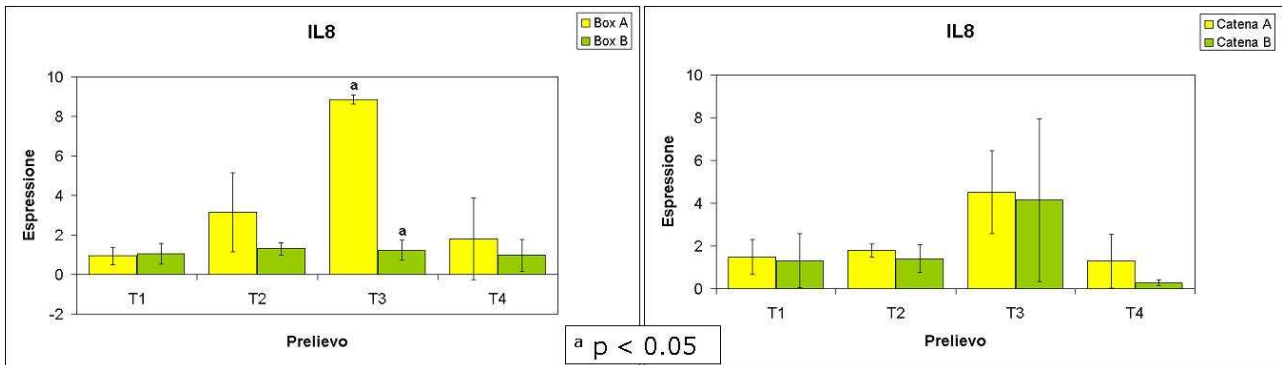
**Tabella 2** – Espressione genica di IL1 $\beta$ , IL6 e TNF- $\alpha$  nei linfociti circolanti.



**Figura 1** – Espressione genica di IFN- $\gamma$ , IL2RA, IL4 e IL8 nei linfociti circolanti.



**Figura 2** – Espressione genica di IFN- $\gamma$  nei due allevamenti a parità di stabulazione.



**Figura 3** – Espressione genica di IL8 nei due allevamenti a parità di stabulazione.

### EFFECTS OF HOUSING SYSTEM ON CYTOKINE mRNA EXPRESSION IN PIEMONTESE BEEF CATTLE

Piemontese beef cattle is one of the most important Italian breed, traditionally tie-stall housed during the fattening period. However, the European Union (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare) bans this model, furthering free-stall housing. The aim of this study was to detect the mRNA expression of some lymphocyte cytokines in both housing groups. Therefore, twenty male, 9-13 months old Piemontese beef cattle were housed in two different farms (A and B). In each farm animals were randomly allotted in two groups (tie-stall vs free-stall). Blood samples were monthly aseptically collected at T1, T2, T3, T4 times. The lymphocytes cells were isolated on Ficoll-gradient. Lymphocytes mRNA extraction were performed by Trizol method according to manufacturer's instructions. Expression of IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL2RA, IL4, IL6, IL8 and TNF- $\alpha$  was evaluated by real time PCR. IFN- $\gamma$ , IL2RA, IL4 and IL8 were significantly different expressed in groups reared at the same housing conditions, over time. No difference was detected between the housing systems considered. Other examined cytokines were unchanged. In conclusion, our results showed a susceptibility of animals to management conditions, rather than a specific housing model.

**Key words:** beef cattle, cytokines, real time PCR, housing.

## **FATTORI PROGNOSTICI DEI TUMORI PERIVASCOLARI CANINI: STUDIO PRELIMINARE SU 32 CASI**

*Carminato Antonio<sup>1\*</sup>, Vascellari Marta<sup>1</sup>, Baioni Elisa<sup>2</sup>, Marchioro Wendy<sup>1</sup>, Capello Katia<sup>1</sup>, Mutinelli Franco<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>IZSve, Laboratorio Istopatologia, Legnaro (PD). <sup>2</sup>IZSPLV, Torino*

I tumori perivascolari (PWTs) rappresentano una classe eterogenea di tumori derivanti dalle componenti cellulari della parete dei vasi. Scopo dello studio è stato valutare possibili fattori prognostici in cani affetti da PWTs. Sono stati considerati 32 casi di PWTs cutanei e sottocutanei inviati all'IZSve da gennaio 2005 a ottobre 2007. I soggetti avevano subito trattamento chirurgico conservativo e non avevano ricevuto radioterapia e/o chemioterapia adiuvante. L'analisi statistica ha preso in considerazione: dimensione e localizzazione del tumore, indice mitotico (MI), indice di proliferazione (ki-67), marker muscolari tempo libero da malattia. Tutti i tumori risultavano positivi alla vimentina e negativi alla proteina S-100, 25/32 positivi alla calponina, 3/32 positivi sia all'actina HHHF-35 sia alla desmina. 18/32 lesioni coinvolgevano gli arti, 7/32 il tronco, 3/32 la regione della testa e del collo. 10/32 presentavano noduli di dimensioni superiori a 5 cm di diametro e il 70% di questi soggetti moriva per metastasi. L'analisi statistica ha evidenziato che la dimensione del tumore correlata a MI e ki-67 hanno un significato prognostico maggiore per la sopravvivenza e la diffusione a distanza piuttosto che per le recidive locali. Ne consegue che la prognosi dei PWTs risulti difficilmente valutabile su base istologica e immunoistochimica. Necessitano ulteriori evidenze in merito alla possibilità che la dimensione del tumore possa rappresentare un fattore prognostico più rilevante dell'istotipo tumorale.

**Parole chiave:** tumori perivascolari, cane, prognosi, immunoistochimica.

### **PROGNOSTIC FACTORS FOR PERIVASCULAR WALL TUMOURS (PWTS): PRELIMINARY STUDY OF 32 DOGS**

Perivascular Wall Tumours (PWTs) are defined as neoplasms deriving from mural cells of blood vessels showing uncertain malignant potential. The aim of this study was to determine possible prognostic factors in a cohort of patients with PWTs. We analysed a database of 32 dogs affected by cutaneous/subcutaneous primary PWTs, submitted for histology to the IZSve from Jan 2005 to Oct 2007. All dogs underwent conservative, limb-sparing surgical treatment with no post-operative radiation or chemotherapy. Size, tumour location, mitotic index (MI), proliferation index (Ki-67), IHC for muscular markers and outcome were evaluated. All tumours were positive for vimentin, negative for S-100 protein. 25/32 were positive for calponin, 3/32 were positive for HHHF-35 actin and desmin. 18/32 lesions involved the limbs, 7/32 the trunk, 3/32 the head and neck. 10/32 dogs presented nodules measuring more than 5 cm in diameter and 70% of those dogs died for distant recurrence. 6 tumours out of 10 dead dogs for tumour recurrence were positive for calponin and negative for both HHHF-35 actin and desmin. Size correlated to MI and Ki-67 of the primary tumour seems to have stronger prognostic significance for survival and distant recurrence than for local relapse. Since histological criteria of PWTs hardly correlate with the biologic behaviour, long term follow up is mandatory for more accurate prognosis.

**Key words:** perivascular wall tumours, dog, immunohistochemistry, prognosis.

# ZIGOMICOSI SISTEMICA IN UNA *Macaca fascicularis* XENOTRAPIANTATA DI RENE

Cavicchioli Laura<sup>1</sup>, Cozzi Emanuele<sup>2,3</sup>, Castagnaro Massimo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova.

<sup>2</sup>CORIT (Consorzio per la Ricerca sul Trapianto d'Organi), Padova. <sup>3</sup>Direzione Sanitaria, Ospedale di Padova

Una *Macaca fascicularis*, sottoposta a nefrectomia bilaterale, ha ricevuto un trapianto di rene da suino transgenico. 15 giorni dopo il trapianto, il primate ha evidenziato un quadro clinico compatibile con insufficienza renale: edema generalizzato con incremento del 20% del peso e aumento dei parametri ematici di funzionalità renale, associati a marcata neutrofilia. 19 giorni post-trapianto, l'animale è stato sottoposto a eutanasia per insufficienza renale e deterioramento delle condizioni generali. L'esame necroscopico ha evidenziato, oltre a rigetto d'organo, edema sottocutaneo diffuso, materiale purulento in corrispondenza della ferita chirurgica, effusione emorragica addominale, aree puntiformi biancastre su fegato, peritoneo, pancreas e sierosa intestinale e linfadenopatia meseraica. L'esame istologico della ferita chirurgica ha evidenziato pannicolite e miosite, piogranulomatose e settiche, focalmente estese, con estesa steatonecrosi, trombosi e reazione da corpo estraneo (filo di sutura) con funghi intralesionali e intravascolari. L'esame istologico della cavità addominale ha evidenziato peritonite e sierosite intestinale, purulenta con trombosi, funghi intralesionali e invasione vascolare e linfonodale; peritonite granulomatosa, con reazione da corpo estraneo (filo di sutura); pancreatite, purulenta e necrotizzante, con funghi intralesionali ed emboli fungini. In base alle caratteristiche morfologiche, la diagnosi eziologica è di zigomicosi cutanea, sistemica ed embolica.

La zigomicosi nell'uomo si osserva in soggetti immunocompromessi, con recente aumentata incidenza tra i riceventi di trapianto d'organo. Nell'animale la via d'ingresso è in genere attraverso una ferita cutanea. La malattia non è contagiosa e l'ambiente è la fonte d'infezione. Il reperto più caratteristico è l'invasione dei vasi ematici, del tessuto perineurale e gli infarti tissutali che determinano una malattia sistemica.

Esiste solo un caso descritto di zigomicosi sistemica in *Macaca fascicularis*, mentre la forma cutanea è stata descritta in altri primati.

**Parole chiave:** *Macaca fascicularis*, zigomicosi, xenotrapianto.

## A CASE-REPORT OF SYSTEMIC ZYGOMYCOSIS IN A KIDNEY-XENOTRANSPLANTED *Macaca fascicularis*

A cynomolgus monkey, bilaterally nephrectomized, received a life-supporting kidney from a transgenic pig. 15 days following transplantation, the animal developed a clinical picture compatible with kidney failure: generalized edema, 20% increase in body weight and increase of renal parameters, associated with severe neutrophilia. Because of kidney failure and poor clinical conditions, the primate underwent euthanasia on day 19. Post mortem examination revealed acute kidney rejection, diffuse severe subcutaneous edema, diffuse, purulent, infiltration of the surgical wound, abdominal cavity hemorrhagic effusion, punctiform whitish areas on liver, peritoneum, pancreas and intestinal serosal surfaces and mesenteric lymph node enlargement and congestion. Morphologic diagnosis of surgical wound was: panniculitis and myositis, pyogranulomatous and septic, with extensive steatonecrosis, thrombosis and foreign body reaction (surgical material) with intralesional and intravascular fungi. Morphologic diagnosis of abdominal cavity revealed: peritonitis and intestinal serositis, suppurative with thrombosis, intralesional fungi and vascular and lymph nodal invasion; granulomatous peritonitis, with foreign body reaction (surgical material); pancreatitis, purulent and necrotizing, with intralesional fungi and fungal emboli.

Based on morphologic features the etiologic diagnosis was: cutaneous, systemic and embolic zygomycosis. Zygomycosis in humans usually occurs in immunocompromised individuals, with a recently rising incidence among organ transplant recipients. In animals traumatic implantation is thought to be the portal of entry for the subcutaneous form. The disease is not a contagious; the environment is the source of all infections. The most prominent findings associated with *Zygomycetes* infection are invasion of blood vessels, perineural tissue and tissue infarctions: systemic disease

To date, there is only one recent case report of zygomycosis in a cynomolgus monkey but a cutaneous form has been reported in other primate species.

**Key words:** *Macaca fascicularis*, zygomycosis, xenotransplantation.

## PROVE DI INFEZIONE SPERIMENTALE DI *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) CON RANAVIRUS: RISULTATI PRELIMINARI

Fioretto Barbara\*, Bovo Giuseppe\*\*, Poppi Lisa\*, Quaglio Francesco\*

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Legnaro, Padova.*

*\*\*Centro Specialistico Dipartimentale di Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Il genere Ranavirus della famiglia Iridoviridae, è causa di gravi malattie con massive mortalità in pesci anfibi e rettili. Lo xenopo liscio o "African clawed frog," *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), rana endemica dell'Africa Australe ed importante organismo modello negli studi di biologia evolutiva dello sviluppo, è stato oggetto di un'indagine al fine di valutare la sensibilità a ranavirus. Girini di *Xenopus laevis*, mantenuti in vasche termostate (25°C) e dotate di areazione, risultati negativi a test virologici per la ricerca di ranavirus e di altre infezioni virali, sono stati sottoposti a infezione sperimentale. Il "challenge" è stato effettuato per bagno di durata variabile con un ceppo di referenza (REV-Like) isolato presso il Centro Specialistico Dipartimentale di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ad una titolazione nota ( $10^{4.50}$  DICT 50/ml). Sono stati, quindi, raccolti campioni per indagini virologiche, istologiche, immunoistochimiche e biomolecolari. L'analisi virologica, con semina su colture cellulari EPC ha mostrato un significativo effetto citopatico. La presenza del virus è stata confermata attraverso immunofluorescenza, indagini biomolecolari con DNA polimerasi e neuro filamento (NF-H1 primers). L'infezione virale non era associata a sintomatologia o mortalità. L'osservazione dei preparati istologici su tessuti ed organi (cute, branchie, tessuto emopoietico, rene, fegato, milza, cuore) non ha rilevato caratteristiche lesioni riferibili a un danno virale ma solo alterazioni aspecifiche su sette tra i soggetti sottoposti ad infezione (lieve edema diffuso, moderata congestione, lievi emorragie focalmente distribuite). Il reisolamento virale, l'assenza di mortalità e di lesioni significative inducono a ritenere *Xenopus laevis*, come organismo sensibile all'infezione in assenza di malattia, e quindi possibile organismo portatore.

**Parole chiave:** ranavirus, *Xenopus laevis*.

## EXPERIMENTAL INFECTION TESTS OF *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) WITH RANAVIRUS: PRELIMINARY RESULTS

Ranavirus is a genus in the family Iridoviridae. Ranaviruses cause disease in fish amphibians, and reptiles with host susceptibility differing among species and developmental stages. They have progressively become prominent pathogens of fish on a global scale.

We carried out an experimental infection under controlled conditions to contribute to the current knowledge on the susceptibility of African clawed frog (*Xenopus laevis*) tadpoles to Rana esculenta virus-like (REV-like). All samples showing clear CPE during virus re-isolation were examined using IFAT and all showed a strong positive reaction. During the polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis of DNA polymerase the specific neurofilament triplet H1-like (NF-H1) protein gene was amplified from all samples. Subclinical infection with either no gross or histological changes or only minimal non-specific histological changes have been reported.

These results suggest the role of *Xenopus* like a carrier of Ranavirus infection. Histopathological and epidemiological data on these agents are lacking, and further investigations are needed to determining what cell types are targeted by the virus and to update the list of susceptible hosts and understand the role of carriers.

**Key words:** ranavirus, *Xenopus laevis*.

## ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DI METALLOPROTEASI 9 (MMP9) NEL MELANOMA IRIDEO FELINO

Giudice Chiara, Stornelli Valentina, Grieco Valeria

*Università degli Studi di Milano, DIPAV, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare*

Il melanoma irideo felino (FDIM) è la neoplasia intraoculare primaria maligna più frequente nel gatto. Recentemente, nell'uomo, è stata dimostrata una correlazione tra l'espressione di metalloproteasi di matrice (MMP9) e la malignità dei melanomi uveali. Scopo del presente lavoro è verificare l'espressione immunoistochimica di MMP9 nel FDIM in relazione al grading istologico della neoplasia.

Sono stati selezionati dall'archivio 43 FDIM. L'esame delle sezioni colorate con ematossilina-eosina ha consentito la classificazione dei tumori in base al grading proposto da Kalishman *et al.* (1998). Sezioni seriate sono state immunocolorate con anticorpo monoclonale anti MMP9 (metodo ABC).

17 FDIM erano di grado 1, 8 di grado 2 e 18 di grado 3. 32/43 FDIM erano MMP9 positivi; 15/18 FDIM di grado 1 erano MMP9 negativi (7 casi) o con positività <10% delle cellule neoplastiche (8 casi). In 5/7 FDIM di grado 2 più del 50% delle cellule era MMP9 positiva. Dei melanomi di grado 3, 1/18 era negativo; MMP9 era positiva in meno del 10% delle cellule in 6/18, tra 11-30% in 2/18 ed in più del 50% in 9/18.

Studi recenti correlano l'espressione di MMPs con la trasformazione maligna delle cellule tumorali nel melanoma uveale dell'uomo. Nei FDIM esaminati, MMP9 era espressa da circa l'80% dei casi. Nell'83% dei FDIM di grado 1 una bassa percentuale di cellule neoplastiche era MMP9 positiva, al contrario nel 70% dei FDIM di grado 2 e nel 50% dei FDIM grado 3 la percentuale di cellule neoplastiche MMP9 positive era > 50%.

I dati del presente studio, sembrano pertanto confermare, anche nel melanoma irideo diffuso felino, la correlazione tra fenotipo maligno ed espressione di MMP9.

**Parole chiave:** melanoma, FDIM, MMPs, gatto, occhio.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF METALLOPROTESASES 9 (MMP9) IN FELINE DIFFUSE IRIS MELANOMA

FDIM is the more frequent malignant primary intraocular neoplasia in the feline species. MMP9 expression in tumor cells has been recently related to tumor progression and malignant switching in human uveal melanomas. Aim of this study was to investigate MMP9 immunohistochemical expression in FDIM and compare the immunolabelling extent with histological grading. Paraffin blocks of 43 FDIMs were selected from the archives. Serial microtomic sections were stained with hematoxylin and eosin for tumor grading (based on 3 grades score proposed by Kalishman *et al.*, 1998) and immunolabelled with mouse monoclonal anti MMP9 antibody (ABC method).

17 FDIM were graded 1, 8 graded 2 and 18 graded 3. MMP9 immunolabelled 32/43 FDIMs. 15/18 grade 1 FDIMs were MMP9 negative or positive in less than 10% of cells (7 and 8 cases respectively) In 5/7 grade 2 FDIMs more than 50% of cells were MMP9 positive. Among grade 3 FDIMs, MMP9 was positive in >50% of cells in 9/18, in <10% of cells in 6/18, in 11-30% in 2 and negative in 1.

In recent studies on human melanomas, MMPs expression in neoplastic cells has been related to malignant transformation of neoplastic cells. In the present study, about 80% of FDIMs were MMP9 immunolabelled. When MMP9 expression was compared with histological tumor grading, 83% of grade 1 FDIMs were poorly immunoreactive, most cases being negative or positive in <10% of cells. On the opposite, in most cases of grade 2 and grade 3 FDIMs, MMP9 immunolabelled more than 50% of neoplastic cells. Based on these data, a correlation between malignant phenotype and MMP9 expression seems to be confirmed also in feline diffuse iris melanoma.

**Key words:** melanoma, FDIM, MMPs, feline, eye.

## **ENDOCARDIOSI NELLE VOLPI (*Vulpes vulpes*): STUDIO ANATOMO-ISTOPATOLOGICO**

**Guarda Franco<sup>1</sup>, Scaglione Frine Eleonora<sup>2</sup>, Grande Davide<sup>3</sup>, Carpignano Mariagrazia<sup>2</sup>, Chiappino Laura<sup>2</sup>, Ferroglio Ezio<sup>3</sup>, Bollo Enrico<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO), Italia.* <sup>2</sup>*Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO), Italia.* <sup>3</sup>*Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO), Italia*

Nel primo semestre del 2011 sono state sottoposte a necropsia presso il Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Torino 55 volpi (*Vulpes vulpes*) (35 maschi e 20 femmine) provenienti dalla Regione Piemonte. Il cuore è stato fissato in formalina tamponata al 10% per le analisi macroscopiche e microscopiche. In 34 casi non erano presenti macroscopicamente lesioni valvolari. In 19 casi (34,5%) sono state rilevate lesioni a carico della valvola tricuspide: 7 endocardiosi, 5 prolapsi valvolari associati a endocardiosi, 3 displasie, 3 ispessimenti e 2 retrazioni valvolari. L'esame istologico del lembo settale della valvola tricuspide ha permesso di evidenziare i quadri classici dell'endocardiosi, caratterizzati inizialmente da focolai mixomatosi, in progressiva estensione fino a trasformare l'intera membrana in un tessuto mixomatoso. Un aspetto singolare, riscontrato finora solo nella volpe, consiste in una trasformazione di entità variabile della zona spongiosa della valvola in tessuto adiposo, associato prevalentemente alla presenza di cellule infiammatorie mononucleate. Non sono invece state rilevate lesioni a carico delle valvole mitrale, semilunari aortiche e polmonari.

Morfologicamente l'endocardiosi in tutte le specie studiate si estrinseca in una trasformazione mixomatosa della sostanza fondamentale della valvola e delle corde tendinee con aumento dei glicosamminoglicani (GAG) e degli acidi ialuronico e condroitinsolforico. Nei mammiferi e nell'uomo colpisce prevalentemente la mitrale e in minor misura la tricuspide e le semilunari. In base ai risultati ottenuti nel presente lavoro, tale patologia nelle volpi colpisce prevalentemente la valvola tricuspide. E' altrettanto dimostrata l'aumento della frequenza e della gravità della lesione con l'aumento dell'età.

**Parole chiave:** cuore, endocardiosi, volpe, *Vulpes vulpes*

## **ENDOCARDIOSIS OF RED FOXES (*Vulpes vulpes*); AN ANATOMO-HISTOPATHOLOGICAL INVESTIGATION**

During the first semester of 2011, fifty-five red foxes (*Vulpes vulpes*) (35 males and 20 females), collected from different provinces of Piedmont (Italy) were analyzed by gross and histopathological investigation. Age class of the animals was determined by tooth eruption and degree of tooth wear. In all animals the heart was collected and fixed in 10% neutral buffered formalin for gross and microscopical evaluation. The heart was examined following the inflow and outflow tracts. On cutting open gross examination of the valvular leaflets revealed lesions of the tricuspid valve in 19 out of 55 samples (34,5%), represented by endocardiosis (n=7), valvular prolapsed associated with endocardiosis (n=5), dysplasia (n=3), thickening (n=3), and valvular retraction (n=2). The histological pattern of the septal leaflet of the tricuspid valve showed the typical lesions of endocardiosis, characterized by initial mixomatous foci, progressively extending up to transform the whole membrane in mixomatous tissue. A peculiarity of the red fox is represented by the transformation of the spongy zone of the valve into adipous tissues, associated with infiltration by mononuclear inflammatory cells. No lesions were detected in the mitral, semilunar aortic and pulmonary valves.

Although based on a limited sample, our investigation suggests the presence of endocardiosis in wild red foxes. Although in mammals endocardiosis is commonly detected the mitral valve, according to our findings in red foxes the disease is prevalent in the tricuspid valve. Our data moreover confirm that with increasing age, endocardiosis appears more frequently and is more severe. Further investigations are needed to elucidate the etiology, pathogenesis and histological patterns of these diseases in wild canid populations.

**Keywords:** heart, endocardiosis, red fox, *Vulpes vulpes*.

## **IL BUMBLEFOOT: OSSERVAZIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE IN RAPACI**

**Lanteri Giovanni<sup>1</sup>, Meduri Filomena<sup>1</sup>, Ricotta Vincenzo<sup>2</sup>, Mazzullo Giuseppe<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina. <sup>2</sup>Veterinario Libero Professionista, Collaboratore Centro Regionale Recupero Fauna Selvatica Bosco Ficuzza, Palermo*

Con il termine “bumblefoot” (“piede gonfio”, pododermatite o podagra) viene indicata tutta una serie di condizioni patologiche di tipo degenerativo e infiammatorio che colpiscono il piede dei rapaci. La lesione si manifesta con un iniziale modico arrossamento dei cuscinetti plantari accompagnato da edema, fino alla comparsa di ascessi profondi o flemmoni che culminano nella necrosi tissutale. Le lesioni vengono generalmente classificate secondo la loro evoluzione in stadi progressivi, dal grado I (eritema di scarsa importanza sulla superficie plantare) al grado VII (coinvolgimento osseo e osteomielite). Il nostro studio ha preso in considerazione 10 rapaci di diversa specie, sia deceduti che in vita. Le lesioni sono state macroscopicamente classificate secondo i dati presenti in letteratura e sono risultate ascrivibili tra quelle comprese tra i gradi I e VI. L'esame istopatologico, effettuato nei soggetti deceduti, permetteva di rilevare patterns dermatopatologici caratterizzati da aspetti diversi in relazione alla gravità della lesione. Le alterazioni da noi documentate indicavano, in generale, fenomeni di discheratosi che, unitamente ai quadri macroscopici, si prestano ad alcune speculazioni etiopatogenetiche nel determinismo della lesione in questa specie, con l'auspicio di poter ulteriormente contribuire alla conoscenza di tale evento patologico.

**Parole chiave:** bumblefoot, rapaci, ipercheratosi, discheratosi, istopatologia cutanea.

### **BUMBLEFOOT: GROSS AND HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN RAPTORS**

The term ‘bumblefoot’ is used to cover the range of inflammatory and/or degenerative conditions that can affect the feet of birds of prey. The lesion appears with a modest initial redness of the pads accompanied by edema, until the appearance of deep abscesses or phlegmons culminating in tissue necrosis. Lesions are usually classified according to their evolution in progressive stages, from grade I (mild erythema on the plantar surface) to grade VII (bone involvement and osteomyelitis). Our study took into account 10 different species of raptors, both deceased or alive. Lesions were macroscopically classified and histopathological examination was carried out in dead subjects. Skin sections revealed patterns characterized by different features of dyskeratosis in relation to the severity of the injury, leading to some speculative etiopathogenic hypotheses of such lesion in this species, with the hope to further contribute to the knowledge of the pathological event.

**Key words:** bumblefoot, raptors, hyperkeratosis, dyskeratosis, skin histopathology.

## **FIBROSI POLMONARE MULTINODULARE EQUINA ASSOCIATA AD EHV-5: RILIEVI ISTOLOGICI ED INDAGINI BIOMOLECOLARI**

**Lepri Elvio<sup>1</sup>, Sforna Monica<sup>1</sup>, Brachelente Chiara<sup>1</sup>, Marenzoni Maria Luisa<sup>2</sup>, Passamonti Fabrizio<sup>2</sup>, Cappelli Katia<sup>2</sup>, Vitellozzi Giovanni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari.*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia*

La fibrosi polmonare multinodulare (Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis: EMPF) è una lesione recentemente tipizzata sul piano clinico e patologico e ormai assunta a sindrome clinica specifica nella specie equina. Prevalentemente descritta negli Stati Uniti, l'EMPF è stata recentemente segnalata anche in Europa (Belgio e Germania). L'eziologia della EMPF non è ancora chiarita; l'Herpesvirus equino-5 (EHV-5) sembra rivestire un ruolo importante, ed il virus è costantemente dimostrato nei soggetti affetti da EMPF, sebbene si evidenzia comunemente anche in soggetti sani. Scopo della segnalazione è descrivere gli aspetti anatomoistopatologici di un caso di EMPF e le valutazioni biomolecolari che, attraverso un'analisi quantitativa della presenza del virus nei diversi tessuti, apporta un ulteriore tassello alla comprensione dell'eziopatogenesi della malattia. Le nostre osservazioni si riferiscono ad un cavallo di 15 anni di età, femmina, di razza belga, affetto da grave sindrome respiratoria cronica. All'esame anatomopatologico le lesioni, limitate alla cavità toracica, erano rappresentate da un evidente aumento di volume diffuso di entrambi i polmoni, che apparivano di colore grigio-rosato e consistenza aumentata; in sezione di taglio era evidente un tessuto fibroso che occasionalmente formava aggregati densi similnodulari; istologicamente era presente una grave fibrosi interstiziale diffusa con epitelizzazione alveolare; i reperti erano riferibili ad una grave polmonite interstiziale diffusa cronica. Nei linfonodi era evidente una iperplasia della corticale con presenza di cellule giganti multinucleate. Al fine di stabilire la presenza e la distribuzione del genoma virale nei tessuti, una PCR quantitativa (qPCR) è stata condotta nei confronti del gene gB di EHV-5. Il genoma virale è stato rinvenuto in tutti i tessuti esaminati con titoli differenti, maggiori nei tessuti con lesioni istologiche (polmone e linfonodi) e, nel polmone, in maniera apparentemente proporzionale alla gravità delle lesioni.

Le osservazioni condotte rappresentano a nostro avviso una ulteriore prova del coinvolgimento di EHV-5 nel determinismo della EMPF, sebbene la conferma definitiva non sia ancora stata ottenuta.

**Parole chiave:** cavallo, polmone, fibrosi polmonare multinodulare, Herpesvirus equino-5, qPCR.

### **EQUINE MULTINODULAR PULMONARY FIBROSIS (EMPF) ASSOCIATED WITH EHV-5: HISTOLOGICAL AND BIOMOLECULAR FINDINGS**

The aim of the study is to describe a case of EMPF. A 15 years-old Belgian gelding was referred for severe respiratory distress; at necropsy major gross findings were confined to thoracic cavity and represented by diffuse bilateral pulmonary enlargement, with gray-pink mottled appearance and increased weight and consistence; on cut surface a diffuse whitish fibrous tissue was present, often coalescing into nodular-like aggregates. Histologically, interalveolar septa were distended by fibrous tissue and lined by columnar cells (epithelization), consistent with severe chronic interstitial pneumonia. EHV-5-DNA presence and viral genomic burden in several tissue samples were investigated by means of qualitative and quantitative PCR for gB of EHV-5. Viral genome was detected in all tissues, with a viral burden higher in lesional organs and, within the lung, in more severely affected areas. These findings are, in our opinion, a further evidence of EHV-5 involvement in the pathogenesis of EMPF, although definitive confirmation of this role is still to be determined.

**Key words:** horse, lung, multinodular pulmonary fibrosis, Equine Herpesvirus-5, qPCR.

## **EPITHELIOGENESIS IMPERFECTA IN UN AGNELLO DI RAZZA SARDA**

**Maestrale Caterina<sup>1</sup>, Masia Mariangela<sup>1</sup>, Marruchella Giuseppe<sup>2</sup>, Di Guardo Giovanni<sup>2</sup>, Mancosu Alberto<sup>3</sup>, Denti Stefano<sup>1</sup>, Macciocu Simona<sup>1</sup>, Ligios Ciriaco<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, "G. Pegreffi", Sassari. <sup>2</sup>Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparative. <sup>3</sup>Associazione Regionale Allevatori, Sassari

L'*Epitheliogenesis Imperfecta* (EI) è una rara condizione patologica congenita descritta negli ovini ed in molte specie domestiche, caratterizzata dalla mancanza di epitelio in aree diversamente localizzate ed estese della cute e/o delle mucose. Tuttavia, questa definizione è molto spesso impropriamente utilizzata per indicare casi di *Epidermolysis Bullosa* (EB), una genodermatosi neonatale nella quale si osserva la perdita dell'epitelio cutaneo e della mucosa a seguito di un difetto giunzionale dermo-epidermico. EI sembra avere una ereditabilità autosomica recessiva come EB, la quale è causata nel cavallo e nella pecora dalla delezione di un tratto dei geni *LAMA3* e *LAMC2*, i quali codificano per due diverse unità della laminina 5. In questo lavoro sono riportati gli aspetti anatomo-istopatologici e genetici di EI rilevati in un agnello di razza Sarda. Le lesioni presentavano una distribuzione bilaterale a livello della cute degli arti e dei padiglioni auricolari, apparendo come aree traslucide, rossastre, prive di vello e nettamente delimitate. Istologicamente si osservava una brusca e completa interruzione del rivestimento epidermico e dei relativi annessi cutanei, mentre non erano presenti le tipiche lesioni bollose descritte in corso di EB. Il quadro lesivo sopra descritto ha consentito di formulare una diagnosi di EI. Preliminari indagini genetiche non hanno evidenziato nel gene *LAMA3*, dell'animale oggetto di studio, né parziali delezioni né mutazioni puntiformi associate alla presenza di EI.

**Parole chiave:** ovino, *epitheliogenesis imperfecta*, genetica.

## **EPITHELIOGENESIS IMPERFECTA IN A SARDA BREED LAMB**

*Epitheliogenesis Imperfecta* (EI) is a rare congenital pathologic condition which has been described in several animal species including sheep. EI-associated lesions are characterized by the absence of epithelium in variably sized areas of the skin as well as of mucous membranes. EI is often misdiagnosed as *Epidermolysis Bullosa* (EB), a neonatal genodermatosis which - at least in horse and sheep - has been causally linked to a partial deletion of *LAMA3* and *LAMC2* genes, encoding for two different laminin subunits. We report herein the anatomo-histopatological and the genetic features of a case of EI in a Sarda breed lamb, which showed bilateral, reddish, translucent, well-demarcated and hairless skin areas at the level of ear pinnae and distal limbs. Histologically, there was absence of both the epidermis and the adnexal structures, whereas bullae or dermo-epidermal clefting were not observed. On the basis of the anatomo-histopatological changes, a diagnosis of EI was made. By preliminary genetic investigations, no partial deletions or point mutations associated with EI were found in the gene *LAMA3* of this lamb.

**Key words:** sheep, *epitheliogenesis imperfecta*, genetics.

## LA LIPIDOMICA QUALE TECNICA DIAGNOSTICA INNOVATIVA PER LO STUDIO DELLE NEOPLASIE DEL TESSUTO ADIPOSO

Marino Fabio<sup>1</sup>, Chiofalo Biagina<sup>2</sup>, De Stefano Carmelo<sup>3</sup>, Panebianco Antonio<sup>1</sup>, Macrì Battesimo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. SA.PU.VET. e <sup>2</sup>MOBIFIPA, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina. <sup>3</sup>Medico Veterinario, Collaboratore esterno

Il lipoma è per definizione benigno, mentre il lipoma infiltrativo presenta caratteristiche infiltrative e destruenti che suggeriscono malignità. È stato suggerito che tale forma tumorale possa rappresentare un tipo di liposarcoma ben differenziato. L'eziologia è sconosciuta, sebbene un errore nel metabolismo del grasso o disfunzioni endocrine o neurologiche sono state proposte quali possibili cause, suggerendo che lo sviluppo del lipoma possa essere dovuto ad un'eccessiva differenziazione di cellule interstiziali mesenchimali in adipociti. Questa nota preliminare mira a proporre un nuovo approccio nello studio delle neoplasie del tessuto adiposo attraverso l'analisi degli acidi grassi della componente lipidica di tessuto muscolare normale e patologico. Un esemplare d'allevamento di spigola adulta (*Dicentrarchus labrax*) presentava tre noduli irregolarmente sferici, non ulcerati, sodo-elastici, sul fianco sinistro del corpo. In sezione il tessuto era di aspetto lardaceo, grigio-biancastro, con alcune aree rosate, riferibili a tessuto muscolare. Tutti gli aspetti descritti all'esame macroscopico e microscopico conducevano ad una diagnosi di lipoma infiltrativo multicentrico. Istologicamente, il tumore, sebbene caratterizzato da adipociti ben differenziati, in assenza di mitosi, mostrava una forte tendenza ad infiltrare i tessuti circostanti, come riportato nella stessa neoplasia dei vertebrati superiori. Gli esami biochimici condotti sugli acidi grassi saturi (SFA) mostravano valori simili in entrambi i campioni (A: 27,99% vs. B: 27,11%; P=0,325); di contro, gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) erano minori (P=0,005) nel tumore (38,46%) rispetto al tessuto normale (43,44%), e gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), in particolare quelli della serie n-3, mostravano valori maggiori (P=0,009) nel tumore (33,54%) rispetto a quelli ottenuti dal tessuto normale (29,45%); nell'ambito dei rapporti solo quello PUFA/SFA ha mostrato valori più elevati (P=0,020) nel tessuto patologico (0,47) rispetto al normale (0,40). I dati ottenuti suggeriscono che la ricerca metabolomica dei lipidi (lipidomica) potrebbe risultare di valido supporto anche per lo studio delle cellule sane e patologiche suggerendo i lipidi quali marker di malignità. Comunque, è ragionevole considerare che in questa neoplasia, incluso il caso qui descritto, un disturbo metabolico possa essere considerato quale punto di partenza nel promuovere l'insorgenza del lipoma. Ulteriori osservazioni in tal senso, anche su specie animali diverse, potrebbero avvalorare o meno l'importanza dei valori biochimici non solo ai fini diagnostici, ma anche prognostici.

**Parole chiave:** lipoma, lipidomica, tumor.,; acidi grassi, istopatologia.

### LIPIDOMIC AS AN INNOVATIVE DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR THE STUDY OF LIPOID NEOPLASMS

A tumour diagnosed as multicentric infiltrative lipoma affecting a single farmed seabass is described. The fish had three masses on its lateral side of the back deforming the skin surface. The masses showed tendency to invade the underlying musculature. Histologically, the neoplasm consisted of differentiated adipocytes. Biochemically, the neoplastic tissue showed lower values of monounsaturated fatty acids and higher values of polyunsaturated fatty acids compared to adjacent normal muscular tissue, particularly of the n3 series such as eicosapentanoic-EPA (C<sub>20:5n3</sub>) and docosahexanoic-DHA (C<sub>22:6n3</sub>) acids. Data obtained suggest a metabolic disturbance in the lipid component of the muscular tissue metabolic pathway which could be the starting point to promote lipoma formation.

**Key words:** lipoma, lipidomic, tumour, fatty acids, histopathology.

## BESNOITIOSI BOVINA (*BESNOITIA BESNOITI*) IN ITALIA: QUADRI ANATOMO-CITO-ISTOPATOLOGICI ED ULTRAISTRUTTURALI

Militerno Gianfranco<sup>1</sup>, Bassi Patrizia<sup>1</sup>, Mandrioli Luciana<sup>1</sup>, Morandi Federico<sup>1</sup>, Gentile Arcangelo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Anatomia Patologica. <sup>2</sup>Sezione di Medicina Interna, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.

La Besnoitiosi bovina, parassitosi segnalata soprattutto in Africa, è causata dal protozoo *Besnoitia besnoiti* (phylum *Apicomplexa*, famiglia *Sarcocystidae*). La malattia è considerata emergente in Europa (*European Food Safety Authority* - EFSA, 2010). I primi casi italiani risalgono al 1993 in animali importati, ma nel 2009-2010 è comparsa in animali nati ed allevati localmente. Nel bovino (ospite intermedio; l'ospite definitivo è ancora incerto) *B. besnoiti* forma caratteristici noduli biancastri di pochi mm, localizzati tipicamente in cute, congiuntiva e sclera. In questa nota sono descritti gli aspetti macroscopici, citologici, istologici ed ultrastrutturali della parassitosi in tre bovini nati e cresciuti in tre differenti allevamenti italiani di Toscana ed Emilia Romagna. I soggetti, un toro chianino e due femmine di razza Frisona e Limousine, mostravano parziale alopecia e grave sclerodermia, più evidente a livello di musello, regione peri-orbitale, scroto o capezzoli. I reperti necroscopici più importanti erano costituiti da numerosi noduli millimetrici biancastri, disseminati in sclera e congiuntiva, nel sottocute, lungo tutta la mucosa di turbinati nasali, laringe e trachea e, in un caso, anche nelle fasce muscolari del dorso e degli arti. L'esame citologico delle lesioni cutanee rivelava poche cellule infiammatorie mononucleate e molti bradizoiti bananiformi liberi. L'indagine istologica confermava la presenza di cisti dermiche o sottomucose di 250-300  $\mu\text{m}$ , con parete a tre strati, contenenti bradizoiti di 7/8x2  $\mu\text{m}$ , circondate da una moderata reazione infiammatoria con prevalenza di macrofagi e granulociti eosinofili. Le caratteristiche morfologiche ultrastrutturali delle cisti e dei bradizoiti erano riferibili a protozoi appartenenti a *Besnoitia besnoiti*.

**Parole chiave:** *Besnoitia besnoiti*, bovino, istopatologia, ultrastruttura, diagnosi.

## INTRODUZIONE

Alla fine del 2009, presso il Servizio di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna viene sottoposto ad esame *post-mortem* ed a successive indagini microscopiche e biomolecolari un toro chianino di 23 mesi, affetto da dermatite crostosa, nato, vissuto e morto in un allevamento toscano della zona del Montefeltro aretino, sull'Appennino tosco-umbro-marchigiano (4, 5). Altri due casi con quadri sovrapponibili sono descritti nel 2010 a Perticara nel comune di Novafeltria (RN), in un bovina frisona di 4 anni, e nel 2011 a Borgo S. Lorenzo (FI), in una bovina Limousine di circa 6 anni. In tutti e tre i soggetti il sospetto clinico di Besnoitiosi (*Besnoitia besnoiti*, phylum Apicomplexa, famiglia Sarcocystidae) è stato confermato con indagini parassitologiche ed istologiche su biopsia, poi osservazioni necroscopiche hanno permesso di valutare caratteristiche e diffusione delle lesioni. Nella presente nota si descrivono i principali aspetti macroscopici, microscopici citologici, istologici ed ultrastrutturali della malattia, per la prima volta comparsa in bovini autoctoni italiani ed in precedenza descritta in Africa, in alcune zone dell'Europa centro-occidentale ed in pochi casi dell'Europa dell'est (3, 9). I casi si associano ad altre segnalazioni analoghe (7).

## MATERIALI E METODI

In tutti i soggetti sono state eseguite biopsie di cute per indagini parassitologiche ed istologiche. Il toro di razza Chianina (1109/09) e la Frisona (713/10) sono stati sottoposti ad eutanasia per essere esaminati in sede necroscopica, mentre la vacca Limousine è stata inviata alla macellazione. In sede necroscopica, nei primi due casi sono stati eseguiti prelievi agoaspirativi cutanei e strisci su vetrino che, una volta asciugati all'aria, sono stati colorati con May Grünwald-Giemsa per l'esame citologico. In tutti, per l'istologia, da organi e tessuti sede di lesioni sono stati prelevati campioni, che fissati in formalina tamponata al 10%, sono stati processati per ottenere sezioni di 5 µm da colorare con ematossilina-eosina (E-E), PAS (*Periodic Acid Schiff*), tricromica di Masson ed impregnazione argentea di Gomori. Per la microscopia elettronica (ME) a trasmissione, campioni di cute fissati in formalina sono stati sottoposti a post-fissazione in tetrossido di osmio (1%), diluito (0,1M) con tampone cacodilato (pH

7,2-7,4), ed inclusi in araldite. Sezioni semifini sono state colorate con blu di toluidina, mentre sezioni ultrafini sono state sottoposte a doppia colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate con microscopio elettronico Zeiss EM 109.

## RISULTATI

I seguenti quadri macroscopici erano comuni a tutti i bovini esaminati: sclerodermia diffusa con estese aree alopeciche lievemente arrossate e/o con croste (soprattutto di scroto o capezzoli, torace, collo, coda, arti, musello e palpebre), presenza di noduli biancastri di pochi millimetri di lunghezza/diametro visibili in congiuntiva palpebrale e sclera, mucosa di vari tratti delle vie respiratorie extra-polmonari (narici, turbinati, laringe) (Fig. 1) e, nella Frisona (713/10), nelle fasce muscolari del dorso e degli arti. In Tabella 1 sono riportate le diagnosi macro- e microscopiche con i dettagli riferibili a Besnoitiosi cronica, oltre a lesioni secondarie od associate. Nel toro chianino (1109/09) esami colturali hanno identificato *Bacillus cereus* come responsabile della bronchite catarrale acuta e di polmonite fibrinosa acuta a focolai apicali. Con l'esame citologico cutaneo (Fig. 2) si osservavano numerosi bradizoiti bananiformi (*banana shaped*) liberi sul fondo dei vetrini con poche cellule mononucleate. L'esame istologico (Tabella 1, Fig. 3) e su sezioni semifini evidenziava numerose cisti di 250-300 µm, piene di bradizoiti di 7/8x2 µm, circondate da una reazione infiammatoria lieve-moderata costituita soprattutto da granulociti eosinofili ed istiociti. La parete delle cisti appariva formata da uno strato interno, uno intermedio di cellule "ospiti" multinucleate (*host cells*), uno esterno connettivale, chiaro e debolmente eosinofilo con E-E (Fig. 3), rosso con il metodo PAS, blu-azzurro con la tricromica di Masson o bruno chiaro con il metodo di Gomori. Tali caratteristiche erano più chiare con la microscopia elettronica, dove accanto alla tipica parete era possibile osservare l'ultrastruttura dei bradizoiti di 7/8x2 µm, riferibili a *B. besnoiti* (Fig. 4 e Fig. 5).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le osservazioni riportate in questo lavoro indicano la presenza di *B. besnoiti* in bovini nati e vissuti nel territorio italiano. Prima del caso 1109/09 (toro chianino) altre segnalazioni di

Besnoitiosi sono state effettuate in bovini d'importazione (1, 8). La *European Food Safety Authority (EFSA)* considera la Besnoitiosi come una patologia emergente su cui indagare per conoscerne prevalenza ed incidenza nelle zone endemiche, modalità di trasmissione e fattori di rischio associati (2). Le nostre osservazioni sottolineano l'importanza di una conferma diagnostica ai quadri clinici conclamati, soprattutto cronici (essendo la sintomatologia acuta aspecifica), già per mezzo di metodiche rapide, veloci, poco invasive e poco costose come la citologia per passare all'identificazione delle cisti con esame istopatologico e del patogeno con metodi sierologici, immunologici e PCR (10, 11). Gli aspetti clinici cutanei osservati e riportati in questo ed altri lavori devono essere differenziati da altre patologie come dermatofitosi, scabbia, intossicazioni od disvitaminosi. (4, 6, 7, 8). I rilievi microscopici hanno mostrato caratteristici quadri di dermatite cronica granulomatosa multifocale-disseminata, con tipiche cisti contenenti bradizoiti provviste di parete a tre strati e reazione infiammatoria circoscrivente con macrofagi, cellule giganti, a volte multinucleate, eosinofili e pochi linfociti. Nel suo insieme la lesione dermica è apparsa e si presenta, in genere, come una particolare reazione granulomatosa in cui i patogeni (bradizoiti) sono contenuti al centro in un ampio vacuolo parassitoforo di una cellula sinciziale multinucleata (strato intermedio), avvolta esternamente da connettivo maturo (strato esterno, blu-azzurro con la Tricromica di Masson e debolmente scura con metodo di Gomori), circondato ulteriormente dal vallo reattivo di cellule infiammatorie prima dette. La cisti o vacuolo parassitoforo ospita i bradizoiti ed appartiene alle cellule multinucleate "ospiti" (*host cells*) dello strato parietale intermedio, mentre lo strato connettivale esterno è creato dall'organismo parassitato. Lo studio metodico ed accurato delle lesioni, della loro distribuzione sulla carcassa in sede di macellazione/necropsia offre utili opportunità di approfondimento della patologia nel bovino, che nel ciclo del protozoo parassita rappresenta l'ospite intermedio. Ricerche ulteriori sono necessarie per rivelare altri casi per far luce sulla modalità di trasmissione e sull'identità dell'ospite definitivo, attualmente nel campo delle ipotesi (2). Come sottolineato da Alcuni Autori, l'indagine ultrastrutturale, mediante impiego della microscopia elettronica a trasmissione, dimostra ulteriormente la presenza di *B. besnoiti*, evidenziando i dettagli della parete

a tre strati delle cisti e dei bradizoiti ospitati nel vacuolo parassitoforo (3).

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano per la collaborazione la Dott.ssa N. Zini del Laboratorio di Biologia Cellulare e Microscopia Elettronica, Istituti Ortopedici Rizzoli (IOR), Bologna.

## BIBLIOGRAFIA

1. Agosti M., Belloli A., Morini M., Vacirca G., 1994. Segnalazione di un focolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. *Praxis*, 15(1): 5-6.
2. EFSA European Food Safety Authority, 2010. Bovine Besnoitiosis: an emerging disease in Europe. Scientific statement on Bovine Besnoitiosis, Question No EFSA-Q-2009-00879, *EFSA Journal*, 8(2):1499. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/1499.htm>.
3. Fernández-García A., Risco-Castillo V., Pedraza-Díaz S., Aguado-Martínez A., Álvarez-García G., Gómez-Bautista M., Collantes-Fernández E., Ortega-Mora L. M., 2009. First Isolation of *Besnoitia besnoiti* From a Chronically Infected Cow in Spain. *J. Parasitol.*, 95(2):474–476.
4. Gentile A., Militerno G., Bassi P., Schares G., Majzoub M., Gollnick N.S., 2010. Su di un episodio di Besnoitiosi bovina in Italia. *Buiatria - Journal of the Italian Association for Buiatrics*, 5(1):3-16.
5. Gollnick N.S., Gentile A., Schares G., 2010. Diagnosis of bovine Besnoitiosis in a bull in Italy. *Letter. Vet. Rec.*, 166(19):599.
6. Jacquiet P., Liénard E., Franc M., 2010. Bovine Besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Vet. Parasitol.*, 174(1-2):30-36.
7. Manuali E., Lepri E., Salamida S., D'Avino N., Mangili P., Vitellozzi G., Grelloni V., Filippini G., 2011. An Outbreak of Bovine Besnoitiosis in Beef Cattle Born in Central Italy. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01220.x.
8. Mutinelli F., Schiavon E., Ceglie L., Fasolato M., Natale A., Rampin F., Carminato A., 2011. Bovine besnoitiosis in imported cattle in Italy. *Vet. Parasitol.*, 178(1-2):198.
9. Schares G., Basso W., Majzoub M., Cortes H.C.E., Rosthaer A., Selmaier J., Hermanns W., Conraths F., Gollnick N.S., 2009. First in-vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from

chronically infected cattle in Germany. *Vet. Parasitol.*, 163(4):315–322.

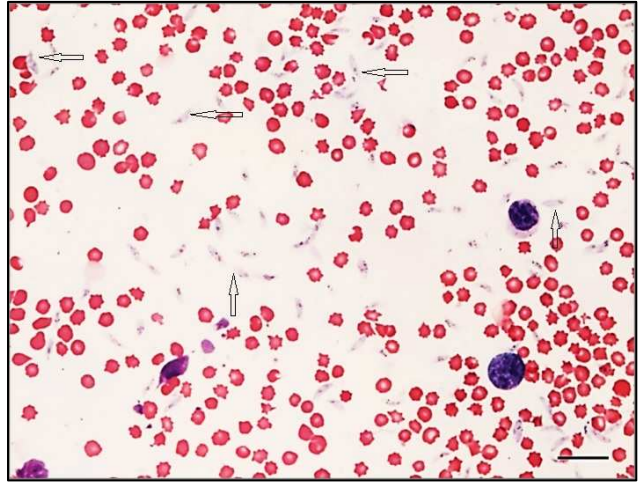
10. Schares G, Basso W, Majzoub M, Rostaher A, Scharr J.C., Langenmayer M.C., Selmair J., Dubey J.P., Cortes H.C., Conraths F.J., Gollnick N.S., 2010. Comparative evaluation of immunofluorescence antibody and novel immunoblot tests for the specific detection of bovine antibodies against *Besnoitia besnoiti*

tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Vet. Parasitol.*, 171(1-2):32–40.

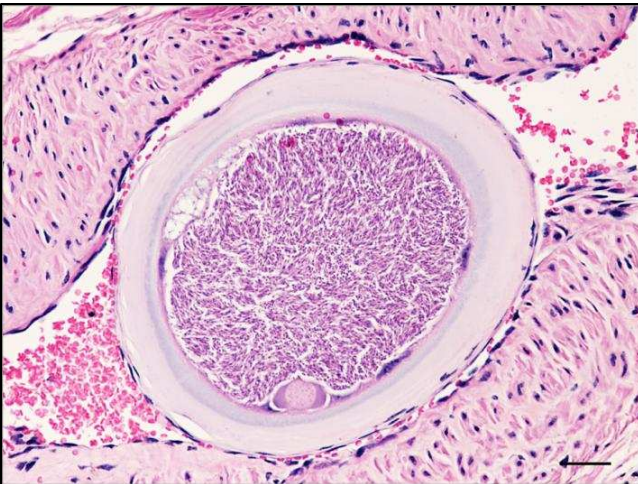
11. Schares G, Maksimov A., Basso W., Moré G, Dubey J.P., Rosenthal B., Majzoub M., Rostaher A., Selmair J., Langenmayer M.C., Scharr J.C., Conraths F.J., Gollnick N.S., 2011. Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*, 178(3-4):208-216.



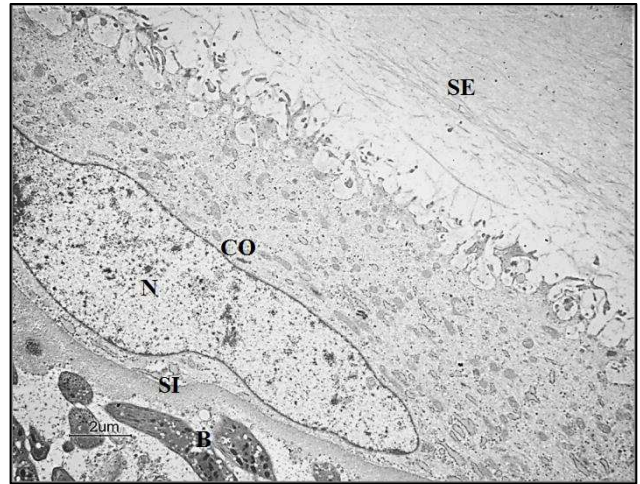
**Figura 1** Caso 713/10, Besnoitiosi (*B. besnoiti*), lesioni nodulari biancastre di pochi millimetri nella mucosa respiratoria della laringe.



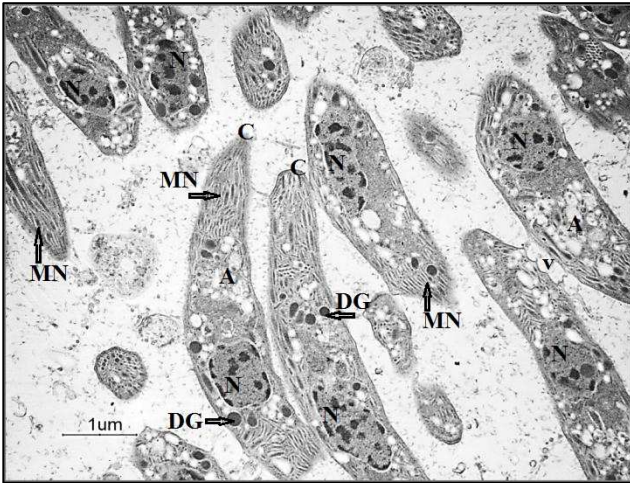
**Figura 2** Caso 1109/09, cute del musello, quadro citologico agoaspirativo: bradizoiti di *B. besnoiti* (frecche) tra le emazie, May Grünwald-Giemsa. Bar 25  $\mu$ m.



**Figura 3** Caso 130/11, sezione istologica cutanea: derma con cisti di *B. besnoiti*. Bar 50  $\mu$ m.



**Figura 4** Caso 130/11, ME: strati della cisti di *B. besnoiti*; da sinistra in basso: bradizoiti banana-shaped (B), strato interno (SI), cellula “ospite” (CO) con nucleo (N), strato esterno (SE). Bar 2  $\mu$ m.



**Figura 5** Caso 130/11, ME: bradizoiti *banana-shaped* (*B. besnoiti*); alcuni sono in sezione, altri mostrano contatti superficiali e vescicole (v). Si vedono: conoide (C) e micronemi (MN, freccia), nucleo (N), granuli densi (DG, freccia), granuli di amilopectina (A). Bar 1  $\mu$ m.

Rif. Caso	DIAGNOSI NECROSCOPICA	DIAGNOSI CITOLOGICA/ISTOLOGICA
<b>1109/09</b> <b>Toro di razza Chianina</b>	Dermatite cronica diffusa con focolai crostosi sparsi (musello, palpebre, scroto); linfadenomegalia sistemica; rinite cronica iperplastica. Altri reperti: nefrite interstiziale cronica bilaterale a focolai; splenomegalia congestizia acuta moderata; ipertrofia parietale dei dotti biliari; idropericardio; bronchite catarrale acuta e polmonite fibrinosa acuta lobare apicale destra e lobulare sparsa a sinistra.	<u>Citologia di lesioni cutanee di scroto, musello e collo:</u> molti bradizoiti bananiformi ( <i>banana shaped</i> ) liberi, poche cellule infiammatorie mononucleate con emazie. <u>Istologia da lesioni cutanee, mucosa nasale, occhio:</u> presenza di cisti dermiche, sottomucose o corneali di 250-300 $\mu$ m con parete a tre strati, contenenti bradizoiti bananiformi di 7/8x2 $\mu$ m, circondate da infiltrato infiammatorio costituito da macrofagi, granulociti eosinofili, pochi linfociti e plasmacellule.
<b>571/10 e 713/10</b> <b>Bovina Frisone</b>	Dermatite cronica diffusa in corso di Besnoitiosi ed alopecia multifocale con aspetti d'ipersecrezione sebacea della cute della testa, soprattutto nella zona perioculare, della coda e dei capezzoli. Piccoli noduli biancastri sono visibili a livello di congiuntiva palpebrale e sclera, di sottomucosa di laringe e cornetti nasali, delle fasce muscolari del dorso e degli arti. Altri reperti macroscopici: cisti ovariche bilaterali; epatite apostematosa focale; pleurite viscerale sub-acuta multifocale.	<u>Citologia di lesioni cutanee:</u> molti bradizoiti bananiformi liberi, poche cellule infiammatorie mononucleate con emazie. <u>Istologia da lesioni cutanee, mucosa nasale, occhio:</u> presenza di cisti dermiche, sottomucose o corneali di 250-300 $\mu$ m con parete a tre strati, contenenti bradizoiti bananiformi di 7/8x2 $\mu$ m, circondate da infiltrato infiammatorio costituito da macrofagi, granulociti eosinofili, pochi linfociti e plasmacellule.
<b>130/11</b> <b>Bovina Limousine</b>	Soggetto esaminato in sede di macellazione. Dermatite cronica diffusa, piú grave a livello di capezzoli. Lesioni millimetriche biancastre riferibili a <i>B. besnoiti</i> sono visibili a livello di cute perioculare, di congiuntiva palpebrale e sclera, di sottomucosa laringo-tracheale.	<u>Istologia da lesioni cutanee, mucosa laringo-tracheale, occhio:</u> presenza di cisti dermiche, sottomucose o corneali di 250-300 $\mu$ m con parete a tre strati, contenenti bradizoiti bananiformi di 7/8x2 $\mu$ m, circondate da infiltrato infiammatorio costituito da macrofagi, granulociti eosinofili, pochi linfociti.

**Tabella 1**

## **BOVINE BESNOITIOSIS (*BESNOITIA BESNOITI*) IN ITALY: GROSS, CYTOLOGICAL, HISTOPATHOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL FINDINGS**

Bovine Besnoitiosis, a parasitic disease endemic in many in African countries, is caused by the protozoan *Besnoitia besnoiti* (*Apicomplexa, Sarcocystidae*). The *European Food Safety Authority* (EFSA, 2010) considers Besnoitiosis an emerging disease. First Italian cases were diagnosed in 1993 in imported animals, but in 2009-2010 the disease was described in cattle born and reared locally. *Besnoitia* spp. forms characteristic whitish, few millimetres long nodules detectable in skin, conjunctiva and sclera. The authors describe macroscopic, cytologic, histopathologic and ultrastructural findings of the systemic parasitic disease in three subjects born and reared in three different farms in central Italy. The animals, a Chianina bull and two cows, a Holstein Friesian and a Limousine, showed mild alopecia and severe scleroderma, more evident in muzzle, eyelids, scrotum or nipples. At necropsy of all animals several lesions were detected in conjunctiva and sclera, within the dermis, the mucosa of nasal turbinates, larynx and trachea and, in one case, within the muscular bands of back and legs. Cytological smears of the skin revealed numerous free banana-shaped bradyzoites with few mononucleate cells. Histology confirmed the presence of many dermal or submucosal cysts of 250 to 300  $\mu$ m, composed by three layers, containing 7.0/8.0 x 2.0  $\mu$ m bradyzoites and surrounded by a mild inflammatory reaction characterized by macrophages and eosinophils. Ultrastructural features of cysts and bradyzoites were consistent with protozoa belonging to *Besnoitia besnoiti*.

**Key words:** *Besnoitia besnoiti*, cattle, histopathology, ultrastructure, diagnosis

## CARCINOMA INFIAMMATORIO MAMMARIO PRIMARIO IN UNA GATTA

*Millanta Francesca, Asproni Pietro, Verin Ranieri, Giannetti Giovanni\*, Lorenzi Davide, Poli Alessandro*

*Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa. ° Ambulatorio Medico Veterinario "Giannetti Repola", Lamporecchio, Pistoia*

*Introduzione:* Il carcinoma infiammatorio (CI) è una forma di carcinoma mammario caratterizzato da comportamento biologico particolarmente aggressivo e prognosi infausta. In oncologia veterinaria sono stati segnalati casi di CI primario e secondario nella specie canina, mentre nella gatta sono descritti tre casi di CI secondario.

*Materiali e metodi:* Il presente studio descrive le caratteristiche cliniche, patologiche ed immunohistochimiche (IHC) (ER-alfa, PR, AR, HER-2, COX-2 e VEGF) di un caso di CI primario felino.

*Risultati.* La gatta, portata alla visita per la rapida insorgenza di una lesione eritematosa ed edematosa in sede inguinale, presentava lesioni dermiche superficiali da papulose a nodulari, in assenza di evidenti masse sottostanti. Era presente edema dell'arto posteriore omolaterale. Tramite indagine citologica mediante agoaspirazione veniva diagnosticata una neoplasia epiteliale maligna. L'indagine radiografica rilevava la presenza di metastasi polmonari. La gatta per scelta dei proprietari veniva sottoposta ad eutanasia e alla necropsia si rilevavano metastasi linfonodali, epatiche e polmonari. L'esame istologico dei noduli evidenziava di una proliferazione di epitelio atipico in strutture tubulo papillari ed embolizzazione nei vasi linfatici del derma superficiale, spesso ectasici, con moderato infiltrato infiammatorio. L' IHC rivelava assenza di immunoreattività agli anticorpi anti- ER-alfa ed AR, positività nei confronti di PR, COX-2 e VEGF. Non si evidenziava overespressione di HER-2, sebbene fosse presente una debole e irregolare positività di membrana.

*Conclusioni:* Questo è la prima descrizione di CI primario della gatta. Le caratteristiche clinico-patologiche e i risultati delle indagini IHC risultano simili a quelle descritte nella donna e nella cagna.

**Parole chiave:** gatto, carcinoma infiammatorio, immunohistochimica, ghiandola mammaria.

## PRIMARY INFLAMMATORY MAMMARY CARCINOMA IN A QUEEN

*Introduction:* Inflammatory breast cancer is the most aggressive form of breast carcinoma. It has been documented in dogs, while in the feline species there are only three cases of secondary IC reported up to now.

*Materials and methods* This study describes the clinicopathological and immunohistochemical (IHC) features of a primary feline IC.

*Results* The cat was presented to the visit for the rapid onset of oedema, severe erythema, local pain and warmth of the inguinal region, with pustular to nodular lesions without an appreciable underlying mass. An epithelial malignant tumour was diagnosed by cytological investigation. Radiology showed the presence of pulmonary metastases. The cat was put to sleep according to the owner's decision. Necropsy revealed lymph node, hepatic and pulmonary metastases. Histology showed an unencapsulated proliferation of malignant epithelial cells arranged in a tubulopapillary fashion, with a massive embolisation in the dermal lymphatics, often ectasic. A mild inflammatory infiltrate was noticed. At IHC, the neoplastic cells were ER-alpha and AR negative, and scattered PR-positive nuclei were observed. HER-2 overexpression was not observed, although an irregular, mild and focal HER-2 immunoreactivity was present. The neoplastic cells were COX-2 and VEGF-2 positive.

*Discussion.* This is the first description of a primary feline IC. The clinicopathologic and IHC features are similar to those describes in human oncology.

**Key words:** cat, inflammatory carcinoma, immunohistochemistry, mammary gland.

## ESPRESSIONE DI RECETTORI TIROSINCHINASICI NEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL GATTO

**Morini Maria, Sabattini Silvia, Bettini Giuliano**

*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater  
Studiorum, Università di Bologna, Ozzano Emilia (Bologna)*

I recettori tirosinchinasici (RTK) sono molecole transmembrana oggetto di grande interesse nella ricerca oncologica per le implicazioni patogenetiche e terapeutiche, la cui espressione è risultata correlata a capacità invasiva e metastatizzante di molte neoplasie epiteliali e mesenchimali dell'uomo, tra le quali il carcinoma squamocellulare (CS) della testa e del collo. Inoltre, la selettiva inibizione di questi recettori appare una promettente strategia terapeutica e sono tuttora in corso studi clinici riguardo all'efficacia di specifici farmaci inibitori.

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare l'espressione immunostochimica di EGFR (*epidermal growth factor receptor*), PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) e KIT (CD117) in 19 CS cutanei di gatto, correlandola a dati clinici, istopatologici (differenziazione, infiltrato infiammatorio, desmoplasia, numero di mitosi, attività proliferativa) e comportamento biologico (*follow-up* post chirurgico a 24 mesi). Sui campioni esaminati, solamente uno non presenta alcuna espressione a tutti e tre i RTK in esame, mentre elevata era la percentuale dei casi positivi a EGFR e PDGFR (rispettivamente 74% e 50%). L'espressione di EGFR appare correlata negativamente all'intervallo libero da malattia ed alla sopravvivenza e sembra possedere significato prognostico negativo; inoltre l'evidenza di una sottopopolazione di CS che contemporaneamente esprime più RTK incoraggia gli studi sulle possibilità terapeutiche di multi-inibitori tirosinchinasici in queste neoplasie.

**Parole chiave:** carcinoma squamocellulare, gatto, EGFR, PDGFR, KIT-receptor.

## INTRODUZIONE

Il carcinoma squamocellulare (CS) è il più frequente tumore maligno della pelle e della bocca nel gatto; è caratterizzato da spiccata invasività locale e scarsa tendenza alla metastatizzazione, e i fattori prognostici sono poco definiti (1,2).

I recettori tirosinchinasici (RTK) sono molecole transmembrana oggetto di grande interesse nella ricerca oncologica per le implicazioni patogenetiche e terapeutiche, la cui espressione è risultata correlata a capacità invasiva e metastatizzante di molti tumori dell'uomo, tra cui i CS della testa e del collo (HNSCC) (3-5). Inoltre, la selettiva inibizione di questi recettori appare una promettente strategia terapeutica e sono in corso studi clinici riguardo all'efficacia di specifici farmaci inibitori. Il RTK maggiormente implicato nei HNSCC è il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), la cui disregolazione è stata associata all'acquisizione di una via autocrina (6-8). Altri RTK coinvolti includono KIT (CD117), il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGFR) ed il fattore di crescita endoteliale vascolare di tipo 3 (VEGFR-3), gli ultimi due considerati fattori di rilievo nei meccanismi di angiogenesi, invasività e metastatizzazione tumorale (4,5).

Nelle neoplasie del gatto l'espressione di RTK non è ad oggi ancora estesamente analizzata. L'espressione immunoistochimica (IIC) di EGFR è stata caratterizzata nel CS della cavità orale in un solo studio su una casistica limitata (9); l'espressione di PDGFR è stata studiata solamente nei sarcomi da inoculo (10) e l'espressione di KIT nei mastocitomi (11) e nei fibrosarcomi (12). Nessun lavoro attualmente pubblicato riporta la co-espressione di due o più RTK nei CS. Risultati parziali di questo studio riguardanti l'espressione di EGFR sono stati oggetto di recente pubblicazione (13).

## MATERIALI E METODI

Campioni di tumori cutanei di gatto (biopsie o escissioni chirurgiche) archiviati con diagnosi di CS, fissati in formalina, inclusi in paraffina, sezionati a 4  $\mu$ m e colorati con EE, sono stati riesaminati per confermare la diagnosi e valutare grado di differenziazione e numero di mitosi in 10 hpf. Sulla base del numero di mitosi osservate, i casi sono stati suddivisi in tumori ad alta o bassa attività mitotica utilizzando il valore mediano come *cut-off*. E' stata inoltre valutata la

presenza di infiltrato infiammatorio linfoplasmocitario o neutrogranulocitario, quantificato come 0, assente; 1, lieve; 2, moderato; 3, elevato, e la presenza o meno di desmoplasia.

Informazioni clinico-anamnestiche e riguardanti il decorso a 24 mesi sono state ottenute tramite interviste telefoniche con i veterinari curanti e i proprietari.

### Immunoistochimica

È stata valutata con metodica IIC standard l'espressione di EGFR (monoclonale, *NeoMarkers*, 1:100), PDGFR-beta (monoclonale, *Histo-Line*, 1:200) e CD117 (policlonale, *Dako*, 1:100), e l'attività proliferativa (monoclonale MIB-1, *Dako*, 1:30).

È stata registrata la localizzazione del segnale (membrana, M; citoplasma, C; nucleo, N) ed è stato attribuito uno score di positività compreso tra 0 e 12 (EGFR score) integrando intensità di positività (da 0 a 3) e percentuale di cellule positive (da 0 a 4); i casi con score  $\leq 2$  sono stati considerati negativi.

### Elaborazione statistica dei dati

I risultati di istologia e immunoistochimica sono stati correlati tra loro e con i dati clinico-anamnestici mediante test di Fisher, correlazione di Spearman e analisi della varianza di Kruskal-Wallis. La rilevanza prognostica delle variabili è stata valutata mediante analisi univariata dell'intervallo libero da malattia (DFI) e della sopravvivenza (OS) (log-rank test). Il livello di significatività (*P*) è stato fissato a 0.05.

## RISULTATI

Sono stati esaminati 19 CS cutanei di gatto, tutti di razza Europea, 9 maschi castrati e 10 femmine sterilizzate. L'età media alla diagnosi era 9.5 anni (range, 1-17). Nove erano a mantello bianco (47.4%) e 13 vivevano all'esterno (68.4%); in 8 casi si registravano entrambe le condizioni (42.1%). I dati anamnestici e clinici, e i risultati del *follow-up* (intervallo libero da malattia ed esito) sono riportati in Tabella I. Istologicamente (Tabella II), 9 CS erano ben differenziati (47.4%), 7 mediamente (36.8%) e 3 poco differenziati (15.8%); il numero medio di mitosi in 10 hpf era pari a 28 (mediana, 24; range, 8-63). In 18 su 19 casi (94.7%) era presente infiltrato linfocitario, in 3 casi (15.8%) lieve, in 4 (21%) moderato e in 11 (57.8%) marcato; in 15 (78.9%) era presente infiltrato neutro-

granulocitario, lieve in 5 casi (26.3%), moderato in 4 (21%) e marcato in 6 (31.6%); era presente desmoplasia in 5 casi (5/19; 26.3%). Il confronto statistico fra i parametri istologici e il *follow-up* ha evidenziato un'associazione significativa per differenziazione (DFI, log-rank,  $P = 0.053$ ; OS, log-rank,  $P = 0.017$ ) e desmoplasia (OS, log rank,  $P = 0.0179$ ); l'attività mitotica non era invece associabile al decorso.

EGFR (Fig. 1) è risultato espresso in 14/19 casi (73.7%), con distribuzione e intensità variabili (EGFR score: media, 6; mediana, 5 score 3-5, 7 casi, 36.8%; score 6-8, 3 casi, 15%; score 9-12, 4 casi, 21.1%; Tabella II). Nella cute normale l'espressione di EGFR era limitata allo stato basale. L'epitelio basale displastico adiacente alcuni CS mostrava un'estensione della positività agli strati sovrastanti. Nei tumori la positività era sempre confinata alla membrana cellulare, con un debole segnale citoplasmatico in 5 casi (26.3%). dimostrabile Non erano evidenti correlazioni statistiche fra dati clinici e istologici ed espressione di EGFR; i CS EGFR+ mostravano un decorso più spesso infausto (9/14, 64% deceduti entro 24 mesi dalla diagnosi; nessun decesso nei 5 casi EGFR-,  $P = 0.022$ ). L'espressione di EGFR era significativamente correlata al decorso (DFI, log-rank test,  $P = 0.008$ ; OS, log-rank test,  $P = 0.039$ ) (Fig. 3).

PDGFR (Fig. 2) è risultato espresso 9/18 campioni idonei (50%), con variabile distribuzione e intensità (PDGFR score: media, 5.5; mediana, 7; Tabella II). La cute normale non esprimeva PDGFR, mentre il derma era diffusamente positivo; negativo anche l'epitelio displastico adiacente i CS. Nei tumori la positività era confinata alla membrana, con concomitante estensione al nucleo in 3 casi (33.3%) e al citoplasma in uno. Nessuna correlazione è stata dimostrabile fra dati clinici e istologici ed espressione di PDGFR, né fra score e intervallo libero da malattia (log-rank,  $P = 0.211$ ) o sopravvivenza (log-rank,  $P = 0.921$ ) (Fig. 3).

*KIT* è risultato espresso solo in 2 CS (11%), con moderata, diffusa positività citoplasmatica e di membrana. *KIT* non era espresso nella cute normale, né nell'epitelio displastico adiacente i CS.

In 7 casi (38.8%) si osservava la coespressione di almeno due dei RTK esaminati: in 2 (11.1%) erano espressi tutti e tre, e in 5 (27.7%) erano coespressi EGFR e PDGFR; la coespressione non era associata a un diverso comportamento biologico.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Nell'80-90% dei HNSCC sono stati rilevati elevati livelli di EGFR, significativamente correlati a una riduzione dei tempi di sopravvivenza (6,8) e diversi studi hanno dimostrato l'effetto antitumorale diretto degli inibitori EGFR-specifici (7). Circa il 74% dei CS cutanei analizzati in questo studio esprime EGFR, con un pattern prevalentemente di membrana. Il concomitante rilievo di una debole positività citoplasmatica di alcuni casi potrebbe essere giustificato da una internalizzazione del complesso recettore-ligando o da una neosintesi della molecola non su base mutazionale. Nessuna correlazione è emersa tra espressione di EGFR e differenziazione; tuttavia il confronto fra questi parametri ed il *follow-up* rivela una prognosi infausta nei casi in cui era presente sia EGFR-positività che scarsa differenziazione. Non si è invece osservata nessuna differenza nel comportamento biologico tra tumori EGFR positivi secondo il sistema di score utilizzato; la potenziale rilevanza prognostica di EGFR deve essere necessariamente testata in un numero più consistente di casi.

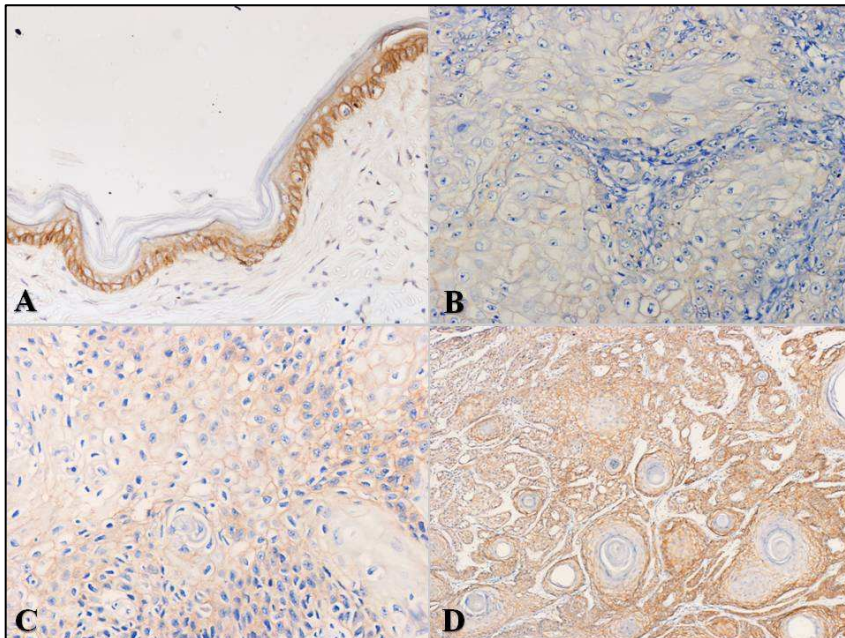
Numerosi studi suggeriscono un ruolo di PDGFR nella crescita dei HNSCC, anche se risultati sono controversi (5). Sulla base delle nostre osservazioni, il segnale non è presente nell'epitelio normale così come nell'iperplastico, al contrario di quanto avviene invece nello stroma di tutti i casi esaminati, con una forte e diffusa positività che appare comunque una condizione di normalità (10). Nella metà circa dei CS si osserva invece chiaramente la presenza di un segnale, con intensità tendenzialmente medio-bassa, e pattern prevalentemente citoplasmatico, come riscontrato anche nei HNSCC (5). L'espressione di PDGFR non appare correlata a parametri istologici e comportamento biologico, e non si osserva nessuna differenza nel comportamento biologico tra tumori PDGFR positivi secondo lo score, anche se la limitatezza numerica della casistica potrebbe avere avuto una significativa influenza sui risultati.

L'espressione di *KIT* non è ancora oggi estesamente analizzata nel HNSCC. Solamente Ongkeko et al. (2005) riportano una positività che varia dal 50% all'80%. Nella nostra casistica abbiamo osservato solo 2 positivi, che co-esprimevano anche gli altri RTK. L'epitelio normale anche nei nostri casi non risultava immunoreattivo.

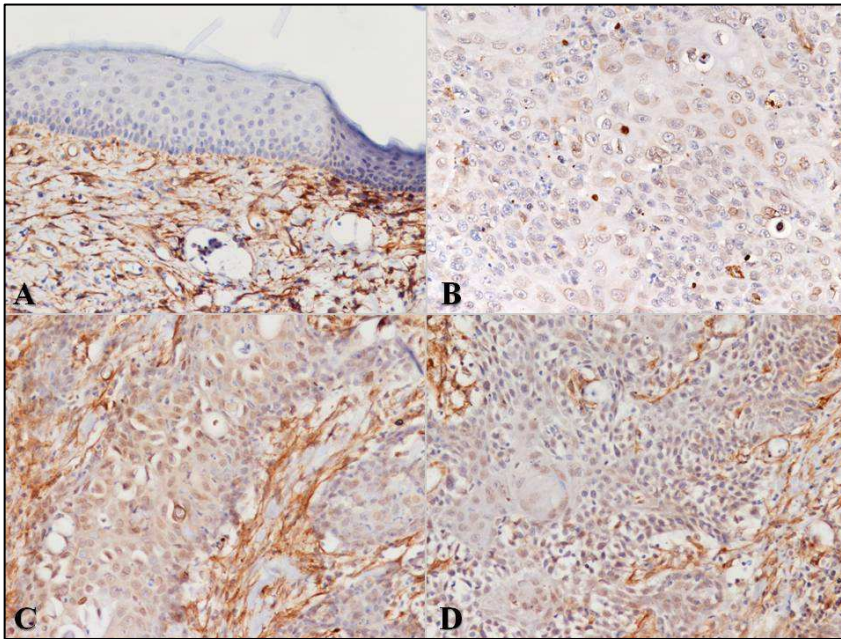
Dai risultati di questo studio non emerge una significativa correlazione fra espressione di RTK e parametri istologici, clinici e prognostici esaminati, fatta eccezione per EGFR, la cui espressione sembra possedere significato prognostico negativo. La maggioranza dei campioni esaminati rivela inoltre una interessante co-espressione di almeno due dei tre RTK analizzati. Questo rilievo appare indicativo di un potenziale contributo dei RTK nella progressione neoplastica di queste neoplasie e di conseguenza rende plausibile l'approccio terapeutico con specifici multi-inibitori. Ulteriore supporto a questa teoria deriva dall'evidenza che solamente una percentuale molto bassa dei campioni non possiede nessuna espressione di nessun RTK. Nonostante le limitazioni dettate dalla scarsa numerosità della casistica, i risultati ottenuti rappresentano una buona base di partenza per ulteriori studi su un numero più elevato di campioni.

## BIBLIOGRAFIA

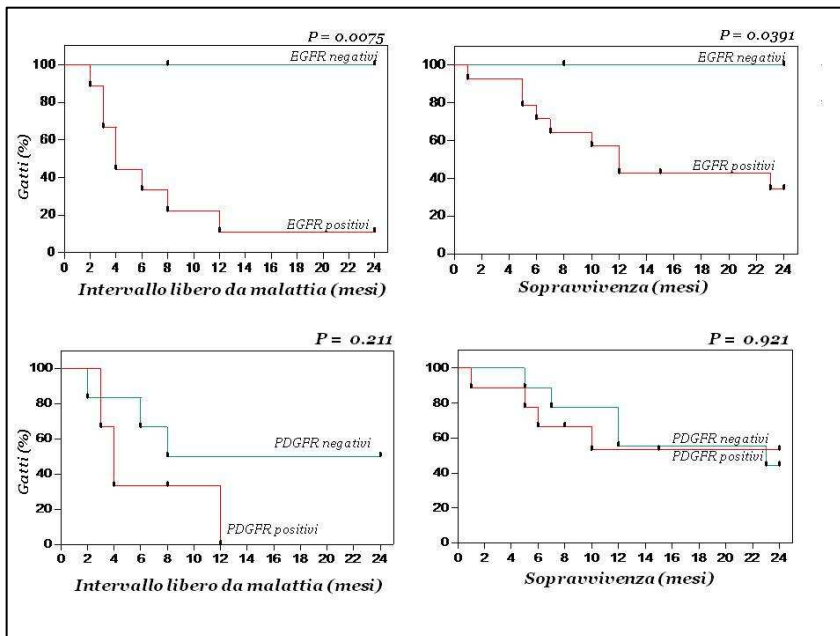
1. Goldschmidt MH et al. *Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals*. 2<sup>nd</sup>, vol 3, AFIP, Washington, 1998, p 21.
2. Gross TL. *Skin diseases of the dog and cat*. Blackwell Science, 2<sup>nd</sup> edn, 2005, pp 581-589.
3. Ongkeko WM et al. *Am J Clin Pathol*. 2005, 124: 71-76.
4. Nelson EG e Grandis JR. *A Future Oncol*. 2007, 3: 353-361.
5. Gockel I et al. *Oncol Reports*. 2008, 20: 845-850.
6. Ang KK et al. *Cancer Res*. 2002; 62: 7350-6.
7. Sheik Ali MA et al. *Cancer Sci*. 2008; 99: 1589-94.
8. Harari PM et al. *Semin Radiat Oncol*. 2009, 19: 63-68.
9. Looper JS et al. *Vet Comp Oncol*. 2006, 4: 33-40.
10. Katayama R et al. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004, 54: 25-33.
11. Sabattini S e Bettini G. *Vet Pathol*. 2010, 47: 643-53
12. Smith AJ et al. *Vet Pathol*. 2009, 46: 934-939.
13. Sabattini S et al. *J Feline Med Surg*. 2010, 12: 760-768.



**Figura 1** EGFR (A) Epidermide normale. Intensa positività di membrana a carico dello stato basale, che decresce negli strati sovrastanti fino a scomparire. (B) CS, caso 5. Debole positività di membrana. (C) CS, caso 10. Moderata e diffusa positività di membrana. (D) CS, caso 17. Intensa e diffusa positività di membrana. Ematossilina di contrasto, 20X e 10X.



**Figura 2** PDGFR (A) Epidermide normale. Epitelio negativo e forte e diffusa positività dello stroma sottostante. (B) CS, caso 17. Debole positività citoplasmatica ed occasionale moderata positività perinucleare delle cellule neoplastiche. (C) CS, caso 14. Moderata e diffusa positività citoplasmatica e nucleare delle cellule neoplastiche. (D) CS, caso 15. Moderata e diffusa positività citoplasmatica e nucleare delle cellule neoplastiche. Ematossilina di contrasto, 20X.



**Figura 3** Curve di Kaplan-Meier per intervallo libero da malattia e sopravvivenza secondo l'espressione di EGFR e PDGFR rispettivamente.

## EXPRESSION OF RECEPTOR TYROSINE KINASES IN FELINE SQUAMOUS CELL CARCINOMA

The aim of this study was to investigate RTK expression in feline cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) and to assess their prognostic role. EGFR, PDGFR and KIT expression was assessed by immunohistochemistry in 19 SCCs and correlated with histological parameters (differentiation, mitotic activity, proliferative activity, desmoplasia, inflammatory infiltrate) and biologic behavior (24 months follow up). Fourteen tumors (74%) were positive for EGFR, nine (50%) for PDGFR and only two (11%) for KIT-receptor. RKT expression was not correlated with tumor differentiation or mitotic activity. Patients with EGFR-positive tumors had a significantly worse outcome ( $P = 0.0217$ ), with decreased DFIs ( $P = 0.0075$ ) and survival times ( $P = 0.0391$ ), but co-expression of multiple RTKs did not affect prognosis. EGFR expression carries a negative prognostic significance in feline SCC. The evidence of RTK co-expression in a subset of SCCs may encourage studies on the application of multi-target RTK inhibitors.

**Key words:** squamous cell carcinoma, cat, EGFR, PDGFR, KIT-receptor.

## **L'ESPRESSIONE DEI MARKERS DI AUTOFAGIA, BECLINA 1, LC3 E P62, NEI MUSCOLI DEI CANI ANZIANI**

*Pagano Teresa Bruna, Costagliola Alessandro, De Biase Davide, Iovane Valentina, Papparella Serenella, Paciello Orlando*

*Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Settore di Anatomia Patologica, Laboratorio di Patologie neuromuscolari, Università degli Studi di Napoli Federico II*

L'autofagia rappresenta uno dei sistemi degradativi potenzialmente coinvolti nella genesi della sarcopenia, ovvero la perdita di massa e forza muscolare specificamente correlata all'invecchiamento. L'autofagia regola il turnover fisiologico di svariati costituenti cellulari mediante un processo multifasico che coinvolge l'attività degradativa lisosomiale. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il ruolo della Beclina 1, della LC3 e della p62 nel determinismo dei danni miopatici nel cane anziano. La Beclina 1 è coinvolta nella formazione delle membrane autofagosomiali e nel sistema di coniugazione "ubiquitin-like", mentre la LC3 è coinvolta nell'elongazione delle membrane e si localizza sulle membrane degli autofagosomi. Questi successivamente si fondono con i lisosomi formando gli autofagolisosomi e il contenuto viene degradato ad opera delle proteasi lisosomiali. In questo meccanismo, la p62 funge da shuttle per il trasporto delle proteine ubiquitinate all'interno dei lisosomi.

40 biopsie muscolari di cani anziani, di età compresa tra i 10 e i 21 anni, sono state esaminate e confrontate con quelle di 5 cani giovani, di età compresa tra 1 e 3 anni. Tra questi sono stati selezionati 10 casi che mostravano lesioni miopatiche alle routinarie colorazioni istologiche ed istoenzimatiche, quali atrofia muscolare di grado medio-grave, alterazioni mitocondriali e vacuolizzazioni intracitoplasmatiche. In 4 tra i casi selezionati, mediante l'impiego di tecniche di immunoistochimica sono state riscontrate positività intracitoplasmatiche per Beclina 1, LC3 e p62, successivamente esaminate anche mediante Western Blot. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un significativo aumento dei livelli di Beclina e di LC3 II unito ad una diminuzione dei livelli di p62 nei soggetti anziani rispetto ai controlli, il che indica un aumento dell'attività autofagica nei cani anziani rispetto agli animali più giovani. I risultati del nostro studio suggeriscono che l'autofagia potrebbe essere uno dei fattori alla base dell'atrofia muscolare riscontrata nei cani anziani, probabilmente attraverso un aumento *age-related* della degradazione lisosomiale delle proteine miofibrillari non compensato da un'efficiente sintesi proteica.

**Parole chiave:** sarcopenia, autofagia, cane, invecchiamento.

## **EXPRESSION OF AUTOPHAGY MARKERS, BECLINA 1, LC3 AND P62, IN THE MUSCLES OF AGED DOGS**

Autophagy is a degradative systems potentially involved in sarcopenia, the age related loss of muscle mass and strength. The purpose of this study was to evaluate the role of Beclin, LC3 and p62 in muscle wasting of aged dog.

40 muscle biopsies from older dogs were examined and compared with those of five young dogs. The samples were processed with routine histological and histoenzimatic stains and 10 cases which showed myopathic lesions such as mild to severe degree of muscle atrophy, vacuolation and mitochondrial alterations were selected. In 4 of these cases, we found intracytoplasmatic positivity for three authophagy markers, Beclin 1, LC3 and p62, by immunohistochemistry. A significant increase in the levels of LC3 II, Beclin 1 and a decreased levels of p62 were found by Western Blot in elderly animals compared to controls, indicating an increase in autophagic activity. Overall, the results of our study suggest that autophagy may be one of the factors underlying muscle wasting in older dogs.

**Key words:** sarcopenia, autophagy, dog, aging.

## MODIFICAZIONI ULTRASTRUTTURALI DEI MIOCARDIOCITI IN UN CASO DI RABDOMIOMA CARDIACO IN UN CINGHIALE (*Sus scrofa*)

Palmieri Chiara<sup>1</sup>, Zappulli Valentina<sup>2</sup>, Caliarì Diego<sup>2</sup>, Della Salda Leonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Dip. Scienze Biomediche Comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo.* <sup>2</sup>*Dip. Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova, Agripolis, Legnaro (PD)*

In medicina umana, il rabdomioma cardiaco - caratterizzato dalla presenza di cellule miocardiche vacuolizzate contenenti glicogeno con un'occasionale aspetto "spider-web"-, rappresenta la più frequente neoplasia cardiaca primaria infantile, mentre è stata descritta raramente in medicina veterinaria, ad eccezione della specie suina. L'eziologia e la patogenesi di tale forma neoplastica risultano poco chiare e si ritiene che rappresenti un amartoma dei miocardiociti o, raramente, delle cellule di Purkinje. Il presente studio fornisce un ampio quadro ultrastrutturale di un caso di rabdomioma cardiaco diagnosticato macroscopicamente e istologicamente in un cinghiale femmina di 2 anni. L'indagine ultrastrutturale ha evidenziato una grave vacuolizzazione citoplasmatica associata a degenerazione miofibrillare e occasionale mancata evidenziazione delle bande A e H. I vacuoli contenevano materiale granulare amorfo, glicogeno, materiale filamentoso e miofibrille residue. Si osservava, inoltre, un'alterata formazione dei sarcomeri, con accumulo di miofibrille non organizzate, in particolare filamenti spessi, e depositi irregolari di materiale tipico della banda Z, indicativi di un grado variabile di differenziazione miofibrillare. Erano osservabili, inoltre, fibrille leptomeriche, streaming ed ipertrofia della banda Z, ispessimenti nemaline rods-like della banda Z, "whorls" di filamenti spessi. I mitocondri, in numero aumentato, presentavano densità flocculari, rods, disorganizzazione delle creste, vacuolizzazioni, creste vescicolari. In conclusione, l'esame ultrastrutturale ha confermato la displasia congenita del tessuto cardiaco con degenerazione miofibrillare e l'origine di tale amartoma nei miocardiociti, come indicato dalla presenza dei dischi intercalari e di strutture tubulari analoghe al sistema T.

**Parole chiave:** rabdomioma, cuore, TEM, cinghiale.

### ULTRASTRUCTURAL MODIFICATIONS OF MYOCARDIOCYTES IN A WILD BOAR (*Sus scrofa*) WITH CARDIAC RHABDOMYOMA

In humans, cardiac rhabdomyoma – characterized by glycogen-filled muscle cells with an occasional spider-web appearance – represents the most common primary cardiac neoplasm in children, while it has been rarely reported in veterinary medicine, except in pigs. The etiology and pathogenesis are still unknown and it is thought to be a hamartoma of myocardiocytes or, less likely, Purkinje fiber cells. The present case report provides a wide ultrastructural description of a grossly and histologically diagnosed cardiac rhabdomyoma observed in a 2-years-old female wild boar. Transmission electron microscopy revealed a severe cytoplasmic vacuolization associated with myofibrillar degeneration and occasional faint A and H bands. Vacuoles contained amorphous granular material, glycogen, filaments and remnants of myofibrils. Moreover, the aberrant formation of sarcomeres, with accumulation of disorganized myofibrils, especially thick filaments, and irregular deposits of Z band-like material, strongly supporting a variable degree of myofibrillar differentiation, were noted. Other features were leptofibrils, Z band streaming and hypertrophy, nemaline rods-like thickening of Z band, thick filaments whorling. Mitochondria displayed woolly densities, rods, cristae disorganization, vacuolization, vesicular cristae. As a conclusion, the ultrastructural examination confirmed the congenital dysplasia and severe degeneration of cardiac tissue and the myocardiocytes as cell of origin, as revealed by intercalated disks and tubular structures similar to T system.

**Key words:** rhabdomyoma, heart, TEM, wild boar.

## STUDIO PRELIMINARE IMMUNOISTOCHEMICO ED ULTRASTRUTTURALE DEL CARCINOMA CUTANEO ANNESSIALE A CELLULE CHIARE DEL CANE

**Palmieri Chiara<sup>1</sup>, Zappulli Valentina<sup>2</sup>, Ferro Silvia<sup>2</sup>, Benali Silvia<sup>3</sup>, Della Salda Leonardo<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Dip. Scienze Biomediche Compare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo. <sup>2</sup>Dip. Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD). <sup>3</sup>BioUniVet s.r.l., Brescia*

Le neoplasie cutanee caratterizzate da cellule chiare o vacuolizzate non sono frequenti nella specie canina e tra di esse particolare interesse è rivolto al carcinoma annessiale a cellule chiare (CCAC), per la sua variabile capacità differenziativa, la difficile individuazione della cellula di origine e le problematiche classificative connesse. Questo studio preliminare è stato condotto su 14 casi di CCAC, di cui 4 sottoposti ad analisi immunohistochimica (panCK, CK5, CK8-18, CALP, CK14, VIM, s100, NSE, GFAP, SMA, chrA, ki67, MHCII, p63) e 3 ad esame ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione. Le neoplasie sottocutanee multilobulate erano caratterizzate da cellule poligonali e fusate, con citoplasma variabilmente vacuolizzato (PAS+, Oil Red O-), occasionalmente bi- e trinucleate, associate a rare strutture simili alla papilla follicolare, aree di differenziazione squamosa e cheratinizzazione. L'indagine immunohistochimica ha evidenziato una positività multifocale per panCK e VIM rispettivamente, associate ad aree negative per entrambi i marcatori e a rare cellule panCK+/VIM+, nonché espressione diffusa di S100. L'esame ultrastrutturale ha confermato la diagnosi di tumore epiteliale caratterizzato da nuclei di piccole dimensioni con cromatina marginata, vacuoli di 2-5 µm di diametro, contenenti materiale granulare proteinaceo ed accumuli di glicogeno, rari filamenti citoplasmatici a disposizione irregolare (vimentina) e fasci di cheratina, desmosomi, rari granuli rotondi di 0.3-0.4 µm di diametro, a singola membrana, moderatamente elettrondensi (granuli simil-neuroendocrini), rari depositi di calcio. I risultati hanno consentito di ipotizzare un'origine annessiale delle lesioni, in particolare da una componente analoga dal punto di vista immunohistochimico alle cellule del bulbo pilifero in grado di seguire linee e gradi differenziativi eterogenei all'interno dello stesso tipo tumorale.

**Parole chiave:** carcinoma annessiale, cellule chiare, cute, cane.

## IMMUNOISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL PRELIMINARY STUDY OF THE CANINE CUTANEOUS CLEAR CELL ADNEXAL CARCINOMA

Malignant skin tumors with clear or vacuolated cytoplasm are uncommon in dog and, among them, clear cell adnexal carcinoma (CCAC) arises great interest for its variable differentiation, tough identification of the cell-of-origin and classification. This preliminary study involved 14 cases of CCAC, of whom 4 and 3 analyzed by IHC(panCK, CK5, CK8-18, CALP, CK14, VIM, s100, NSE, GFAP, SMA, chrA, ki67, MHCII, p63) and TEM, respectively. Multilobular subcutaneous masses were characterized by polygonal, spindle, and variably vacuolated cells (PAS+, Oil Red O-), occasionally bi- and tri-nucleated, with rare dermal papilla-like structures, squamous differentiation and keratinization. IHC revealed multifocal expression of panCK and VIM, intermixed with areas negative for both markers and rare panCK+/VIM+ cells, as well diffuse S100 expression. TEM confirmed the diagnosis of epithelial tumor characterized by small nuclei, marginated chromatin, 2-5µm in diameter vacuoles, containing proteinaceous granular material and glycogen, rare haphazardly arranged cytoplasmic filaments (vimentin) and keratin bundles, desmosomes, rare round 0.3-0.4 µm in diameter single membrane-bound moderately electrondense granules (neuroendocrine-like), rare calcium deposits. These results suggest an adnexal origin of the tumors, specifically from a cell immunohistochemically similar to the bulge region and able to follow different degrees and lines of differentiation within the same lesion.

**Key words:** adnexal carcinoma, clear cells, skin, dog.

# **RUOLO DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE E DELLA REAZIONE URANAFFINE NELLA DIAGNOSI DEI CHEMODECTOMI DEL CANE**

**Palmieri Chiara, Pirocchi Valeria, Della Salda Leonardo**

*Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Dip. Scienze Biomediche Comparete, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*

La diagnosi dei tumori neuroendocrini e, nel caso in esame, dei chemodectomi, può rappresentare in alcuni casi una sfida per il patologo, per la possibile scarsa differenziazione cellulare che limita la validità dei risultati immunoistochimici e la difficoltà di disporre di un pannello di anticorpi utili per la caratterizzazione dei prodotti neurosecretori. Inoltre, le reazioni argirofile possono risultare deboli, solo localmente positive o assenti. Per la conferma diagnostica, quindi, può essere utilizzata l'analisi al TEM combinata alla reazione uranaffine, colorazione citochimica ultrastrutturale che identifica i nucleotidi adeninici in organuli contenenti amine biogene. Lo studio è stato condotto su 5 chemodectomi del corpo aortico (3/5) e carotideo (2/5), sottoposti a colorazioni argirofile (Grimelius, Churukian-Schenk), TEM di routine e reazione uranaffine (trattamento con una soluzione di 0.9% NaCl per 48 hrs e successivamente con acetato di uranile 4% per 48hrs a 4°C). La reazione uranaffine è risultata positiva (granuli elettrondensi, debole o assente contrastazione delle componenti intracellulari, ad eccezione di cromatina e ribosomi) in tutti i casi esaminati, anche in presenza di autolisi cellulare, reazione argirofila debole o negativa, basso numero di granuli neurosecretori. L'esame ultrastrutturale ha evidenziato, inoltre, un notevole pleomorfismo dei granuli (diversa elettrondensità della matrice e compartimentalizzazione del contenuto), correlati alla variabilità del grado di maturazione, della concentrazione di sostanze ormonali e nucleotidi e dei meccanismi di secrezione. In conclusione, l'esame ultrastrutturale potenziato dalla reazione uranaffine è consigliato in tutti i casi dubbi di chemodectoma ed, in generale, in tutte le forme neoplastiche in cui si ipotizza una differenziazione neuroendocrina.

**Parole chiave:** chemodectoma, microscopia elettronica, reazione uranaffine, cane.

## **DIAGNOSIS OF CANINE CHEMODECTOMA: ROLE OF THE TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY AND URANAFFIN REACTION**

The diagnosis of neuroendocrine tumors and, specifically in this case, chemodectomas, could be a challenge for pathologists, due to the poor differentiation resulting in misleading immunohistochemical results and the limited availability of antibodies for the characterization of neurosecretory products. Moreover, argiophilic staining could give a faint, randomly positive or negative reaction. Therefore, TEM associated with uranaffin reaction – a cytochemical stain localizing adenine nucleotides in organelles storing biogenic amines – should be applied. In the present study, 5 chemodectomas of aortic (3/5) and carotid (2/5) body have been submitted for argiophilic stains (Grimelius, Churukian Schenk), routine TEM analysis and uranaffin reaction (treatment with 0.9% NaCl for 48 hrs and 4% uranyl acetate for 48 hrs at 4°C). Uranaffin reaction was positive (electrodense granules, lack or faint staining of other cell components, except chromatin and ribosomes) in all cases, also those negative or poorly stained by argiophilic methods, with scarce granules or advanced autolysis. Furthermore, TEM examination revealed an high granules pleomorphism (different electron density and content compartmentalization), related to variable maturation, hormones and nucleotides levels and mechanisms of secretion. Finally, TEM analysis strengthened by uranaffin reaction is recommended in all doubtful chemodectomas and, generally, in all tumors with suspected neuroendocrine differentiation.

**Key words:** chemodectoma, electron microscopy, uranaffin reaction, dog.

## **PATOLOGIA E PATOLOGIA CLINICA NELL'AMBITO DI UN PROGETTO INTEGRATO DI GENOMICA APPLICATA ALLE PRODUZIONI E ALLA SANITÀ ANIMALE: IL PROGETTO PROZOO**

**Paltrinieri Saverio<sup>1,2</sup>, Giordano Alessia<sup>1,2</sup>, Moretti Pierangelo<sup>2</sup>, Binanti Diana<sup>1,2</sup>, Sironi Giuseppe<sup>1,2</sup>, Scanziani Eugenio<sup>1,2</sup>, Williams John<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano. <sup>2</sup>Laboratorio centralizzato, Azienda Polo Veterinario di Lodi, Università degli Studi di Milano. <sup>3</sup>Parco Tecnologico Padano, Lodi

ProZoo è un progetto multidisciplinare che coinvolge 8 enti di ricerca e associazioni allevatori della Lombardia. Il progetto ha l'obiettivo di sviluppare tecniche genomiche per l'identificazione di caratteri di funzionalità biologica (efficienza produttiva, fertilità, resistenza alle malattie) e per lo sviluppo di test diagnostici per la qualità, la sicurezza e l'autenticità dei prodotti alimentari e per l'identificazione di patogeni responsabili delle principali patologie.

In quest'ambito la patologia clinica gioca un ruolo chiave nella prima selezione dei soggetti da genotipizzare, durante la quale i bovini con patologie subcliniche verranno identificati attraverso un pannello di test ematologici, biochimici ed elettroforetici in grado di rilevare alterazioni metaboliche e stati infiammatori. Gli stessi test verranno utilizzati per la valutazione della gravità della patologia in animali con forme clinicamente evidenti.

Il patologo è invece coinvolto nella caratterizzazione delle lesioni identificate in azienda ed al macello. Particolare rilievo verrà dato alla dermatite digitale del bovino (Mortellaro's disease) che verrà affrontata mediante studio anatomoistopatologico delle lesioni podali e attraverso l'identificazione, in collaborazione con i partner in grado di genotipizzare i batteri presenti, delle spirochete sospettate di essere coinvolte nella patogenesi della malattia. Infine, è prevista l'istituzione di un registro delle malformazioni dei bovini allevati nel comprensorio Lombardo attraverso la raccolta di dati macroscopici ed istologici rilevati in animali malformati conferiti dalle associazioni allevatori, corredati dalla ricerca di potenziali agenti causali e da analisi molecolari, al fine di integrare le osservazioni morfologiche con dati di genetici, microbiologici e tossicologici.

**Parole chiave:** ProZoo, genomica, patologia clinica, anatomia patologica, produzioni e sanità animale.

### **PATHOLOGY AND CLINICAL PATHOLOGY WITHIN AN INTEGRATED PROJECT FOCUSED ON APPLIED GENOMIC APPLIED TO ANIMAL HEALTH AND ANIMAL PRODUCTION: THE PROZOO PROJECT**

ProZoo is a multidisciplinary project involving 8 scientific partners from the Lombardy region (research Institutions and breeding associations). The objective of the project is to develop genomic techniques to identify functional characters (productive efficiency, fertility, resistance to diseases) and to develop diagnostic tests for food quality, safety and traceability and for the identification of pathogens involved in diseases of livestock.

Within the project, clinical pathology plays a key role in the identification of animals to be genotyped. Specifically, animals with subclinical infection will be identified using hematological, biochemical and electrophoretic tests able to detect metabolic and inflammatory disorders. These tests will be used to evaluate the severity of the disease in clinically ill animals.

Indeed, the pathologist is involved in the characterization of lesions detected *in vivo* or at the slaughterhouse. Particular emphasis will be paid to the digital dermatitis (Mortellaro's disease), that will be investigated through an morpho-histopathological study of the lesions and through a collaboration with the scientific partners that will genotype the spirochetes suspected to be involved in the pathogenesis of the disease. Moreover, the pathologists are involved in the establishment of a "register of malformation" of livestock in Lombardy. To this aim, on animals with malformations sent to our Institution by breeding associations, gross and histological findings and microbiological and molecular tests will be performed and integrated to each other to characterize the malformation.

**Key words:** ProZoo, genomics, clinical pathology, morbid pathology, animal health and production.

## ASPETTI ANATOMOPATOLOGICI IN UN CASO DI LINFOMA A CELLULE T ASSOCIATO AD ENTERITE “COELIAC-LIKE” IN *Lemur catta*

**\*Pascotto Ernesto, \*Volpatti Donatella, \*\*Magnone William, \*\*Sandri Camillo, \*Galeotti Marco**

*\*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Udine. \*\*Parco Natura Viva, Bussolengo - Verona*

Un esemplare di *Lemur catta* (femmina, 5 anni, 1,7 Kg), appartenente ad una collezione di circa 30 lemuri ospitata presso il Parco Natura Viva di Bussolengo (VR), è stato visitato con sintomi di dolore addominale, inappetenza, apatia. La palpazione e la diagnostica per immagini evidenziavano una massa radio-opaca (Ø 3-4 cm) in cavità addominale che risultava intestinale alla successiva laparotomia esplorativa. Si procedeva quindi ad una ampia exeresi del tratto enterico interessato (digiuno). Sotto il profilo anatomopatologico la lesione consisteva in un ispessimento a manicotto, sub-occludente, a superficie liscia, lungo circa 5 cm. Istologicamente esso appariva costituito da un intenso infiltrato linfoide neoplastico, con arrangiamento pseudo-follicolare ed elevata attività citocinetica (alto indice mitotico e necrosi puntiforme), omogeneamente positivo all'anticorpo anti CD3 (DakoCytomation, Denmark). Il tessuto intestinale periferico appariva coinvolto da una enterite cronica atrofico-infiltrativa assimilabile al grado 4 della classificazione istologica Marsh-Oberhuber usata nella celiachia umana. Dopo circa un mese, l'aggravamento del quadro clinico portava a morte il soggetto. La necropsia permetteva di evidenziare un quadro infiammatorio “coeliac-like” diffuso in gran parte dell'intestino tenue; un imponente infiltrato linfoide neoplastico CD3+ del parenchima epatico e splenico (con le medesime caratteristiche morfologiche di quello già descritto nella lesione precedentemente asportata). Nel complesso, il caso studiato può essere inquadrato come un'associazione tra una sprue non tropicale ed un linfoma intestinale di tipo T. Un legame statistico eziopatogenetico tra celiachia e linfoma T è sottolineato da numerosi autori in medicina umana. Valutazione anatomopatologiche dettagliate sulle enteropatie delle proscimmie appaiono di rilevante interesse applicativo nella gestione dei protocolli alimentari in cattività.

**Parole chiave:** *Lemur catta*, enterite simil-celiaca, linfoma intestinale, immunistochimica.

### INTESTINAL T-CELL LYMPHOMA ASSOCIATED TO “COELIAC-LIKE” ENTEROPATHY IN A RING-TAILED LEMUR (*Lemur catta*): ANATOMOPATHOLOGICAL FEATURES

A *Lemur catta* (female, 5 years old, 1.7 kg), belonging to a collection of 30 lemurs housed at Parco Natura Viva of Bussolengo (VR), was submitted to clinical investigation due to symptoms of abdominal pain, loss of appetite, apathy. The clinical palpation and the radiographic images showed a radio-opaque mass (Ø 3-4 cm) involving the jejunum, as confirmed by the subsequent laparotomy. The intestinal tract of concern was surgically resected and gross examination revealed a sub-occlusive thickening of the small bowel (length 5 cm). Histologically, the lesion consisted of a heavy malignant lymphoid infiltrate, with pseudo-follicular pattern, high mitotic index and punctiform cellular necrosis. The infiltrate was homogeneously CD3+ (DakoCytomation, Denmark). The tissue peripheral to the lesion was affected by a chronic atrophic enteritis, similar to that characterizing the Grade 4 Marsh-Oberhuber histological classification proposed in human coeliac disease. After about one month, the clinical worsening led the subject to death. The necropsy highlighted only an inflammatory “coeliac-like” anatomopathological pattern involving the whole small intestine. A massive CD3+ malignant lymphoid infiltrate was detectable also in the liver and spleen parenchyma (the morphology of cells was similar to that already described in the previously excised lesion). Overall, the case suggests an association between a non-tropical sprue and a intestinal T-cell lymphoma. A correlation between coeliac disease and intestinal T cell lymphoma is well documented in human pathology. A detailed insight on the histopathological features characterising the enteropathies in prosimians seems to be of interest in the management of captive diet and feeding protocols.

**Key words:** *Lemur catta*, coeliac-like enteropathy, intestinal lymphoma, immunohistochemistry.

## UN CASO DI GANGLIONITE LINFOPLASMACELLULARE DEI PLESSI MIOENTERICI ASSOCIATA AD INFEZIONE DA EHV-1 IN UN CAVALLO

Pavone Silvia<sup>1</sup>, Sforza Monica<sup>1</sup>, Gialletti Rodolfo<sup>2</sup>, Prato Stefano<sup>2</sup>, Marenzoni Maria Luisa<sup>2</sup>, Mandara Maria Teresa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari.*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Italy*

Le neuropatie del Sistema Nervoso Enterico (SNE) sono entità raramente segnalate nel cavallo. In questo lavoro riportiamo un caso di ganglionite progressiva dei plessi mioenterici in un cavallo trotatore di 7 anni con anamnesi di coliche ricorrenti. In sede chirurgica, il cavallo mostrava una costipazione del piccolo colon associata ad una grave atrofia del colon dorsale destro. In sede necroscopica sono stati raccolti campioni da tutti i tratti intestinali per un esame istopatologico di routine e per una valutazione morfometrica degli elementi del SNE. E' stata inoltre effettuata una valutazione immunoistochimica nei confronti degli antigeni CD3, CD20, enolasi neurone-specifica (NSE), sinaptofisina, proteina S100, GFAP e ERV/EHV-1. Inoltre, sono stati eseguiti esami batteriologici e test di PCR per la ricerca dell'EHV-1 su campione intestinale.

L'esame istopatologico dell'intestino ha evidenziato una ganglionite diffusa dei plessi mioenterici. L'infiltrato infiammatorio risultava prevalentemente composto da linfociti CD3+ e plasmacellule. Rispetto ai nostri dati di controllo, è stata osservata una diminuzione significativa del numero dei gangli mioenterici e delle cellule neuronali, e un aumento significativo della percentuale dei neuroni cromatolitici e necrotici. Inoltre, in tutti i tratti intestinali appariva aumentato lo spessore del tessuto connettivo perigangliare. Le cellule neuronali mostravano una marcata riduzione dell'immunoreattività nei confronti della NSE e della sinaptofisina. Le indagini di IHC nei confronti della proteina S100 e della GFAP hanno mostrato un aumento della densità della glia enterica. Esse hanno rivelato inoltre positività nei confronti dell'antigene ERV/EHV-1 nell'endotelio e in isolate cellule enterogliali e linfocitarie. Il test PCR per EHV-1 eseguito su campione intestinale ha mostrato segnale positivo.

Sulla base dei dati raccolti, è stata emessa una diagnosi di sindrome intestinale cronica idiopatica pseudo-obstruttiva (CIPO) associata ad una ganglionite linfoplasmacellulare diffusa, caratterizzata da una popolazione prevalente di cellule T, suggestiva di patogenesi immunomediata. I risultati delle indagini immunoistochimiche e del test di PCR avvalorano un possibile rapporto eziologico tra infezione da EHV-1 e la ganglionite dei plessi mioenterici osservata. Questo caso mostra evidenti analogie cliniche e morfologiche con la CIPO dell'uomo associata all'azione di virus neurotropi enterici, quali gli herpes virus e il poliomavirus.

**Parole chiave:** cavallo, ganglionite, EHV-1.

### A CASE OF LYMPHOPLASMACELLULAR MYENTERIC GANGLIONITIS ASSOCIATED WITH EHV-1 INFECTION IN A HORSE

We describe a case of progressive myenteric ganglionitis in a 7-year-old trotter horse with a history of recurrent colics. At laparotomy, an impaction of the small colon associated with a severe atrophy of the right dorsal colon was found. At post-mortem histological examination a diffuse enteric ganglionitis consisting mainly of CD3+ lymphocytes and plasma cells was observed. A significant decrease of ganglia and ganglion cells were recorded in all the examined intestinal tracts while chromatolytic and necrotic neurons, and thickness of perigangliar connective tissue were significantly increased. Immunolabeling and semi-nested PCR test for ERV/EHV-1 performed on the gut were positive. This case shows interesting similarities with the human chronic idiopathic intestinal pseudo-obstructive syndrome associated enteric neurotropic viruses.

La bibliografia è disponibile presso gli autori.

**Key words:** horse, ganglionitis, EHV-1.

## ASPETTI ISTOPATOLOGICI, IMMUNOISTOCHEMICI E MOLECOLARI IN QUATTRO CASI DI LEISHMANIOSI FELINA

**Puleio Roberto<sup>1</sup>, Tamburello Anna<sup>1</sup>, Lupo Tiziana<sup>1</sup>, Migliazzo Antonella<sup>1</sup>, Loria Guido Ruggero<sup>1</sup>, Pennisi Maria Grazia<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. <sup>2</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Messina

La Leishmaniosi, endemica in Sicilia, ha nel cane il suo principale “reservoir” domestico nei confronti della malattia dell’uomo, mentre ancora incerto appare il ruolo epidemiologico di altre specie domestiche e selvatiche. La Leishmaniosi nel gatto, specie che sembrava avere una minore sensibilità, è in crescita e comincia ad essere documentata anche nella bibliografia scientifica. In questo lavoro si descrivono gli aspetti diagnostici istopatologici e molecolari di quattro gatti affetti da Leishmaniosi confermati anche con indagini di immunoistochimica. In due soggetti le lesioni erano circoscritte alla cute con formazione di ulcere e croste sul naso e punta delle orecchie. Tutti i soggetti esaminati, appartenenti a proprietari diversi, avevano una reattività anticorpale nei confronti di *Leishmania infantum* e a seguito dei prelievi di sangue in toto, di punch cutaneo, di puntato linfonodale, hanno dimostrato la presenza di Leishmaniosi con PCR quantitativa ad alta carica. Le biopsie cutanee eseguite mostravano una flogosi granulomatosa diffusa, a carico del derma, con infiltrazione di macrofagi, linfociti e plasmacellule. L’epidermide sovrastante mostrava fenomeni di ipercheratosi in un caso, mentre nell’altro si osservava una ulcerazione. Nel citoplasma di numerosi macrofagi si evidenziavano corpi ovalari con nucleo eccentrico, compatibili con forme amastigote del parassita. In altri due soggetti è stato possibile effettuare le necroscopie ed evidenziare le lesioni istologiche localizzate a carico del fegato e dei reni. Il fegato mostrava dei microgranulomi costituiti da macrofagi, contenenti alcuni amastigoti, linfociti e plasmacellule; i reni evidenziavano una nefrite granulomatosa, caratterizzata da aggregati linfoplasmacitari con macrofagi al cui interno si osservavano amastigoti. In tutti i casi riportati le indagini immunoistochimiche effettuate hanno evidenziato positività per *Leishmania* spp. In conclusione gli autori, riportando una casistica occorsa nelle attività diagnostiche routinarie, avallano l’ipotesi del mutato ruolo del gatto quale specie sensibile nei confronti dell’infezione da *Leishmania infantum*; mentre resta ancora da chiarire il suo ruolo epidemiologico ossia se anche questa specie al pari del cane possa rappresentare un “reservoir” domestico (anche se di minore importanza), in particolare in aree ove la malattia risulta essere endemica, indubbio appare la presenza della malattia nel gatto con sintomatologia dermatologica compatibile e/o alterazioni del profilo biochimico-clinico (alterazioni della funzionalità renale). I risultati ottenuti consentono ancora di riflettere sul valore dell’istopatologia e dell’immunoistochimica, in associazione a tecniche di biologia molecolare, per la diagnosi della Leishmaniosi felina.

**Parole chiave:** leishmaniosi, gatto, immunoistochimica.

### HISTOPATHOLOGY, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND PCR DIAGNOSTIC TOOLS ON FOUR CASES OF FELINE LEISHMANIOSIS

Authors report four cases of leishmaniosis in cats living in Sicily. The presence of *Leishmania* was detected by histopathology, immunohistochemistry and PCR. Feline leishmaniosis is a quite uncommon feature, even though some sporadic cases have been reported from Portugal, France, Spain and Italy. Cutaneous leishmaniosis was the most frequent form. Typical signs included ulcer and crusty lesions on the nose and ears. Visceral leishmaniosis is rare in cats and involved liver and kidney. Histologically the most common lesion was a granulomatous inflammation with macrophages containing several amastigotes bodies. Results of the study confirm the value of histopathological and immunohistochemical technique, in association with PCR, to confirm the clinical suspicion of feline leishmaniosis.

**Key words:** leishmaniosis, cat, immunohistochemistry.

## CONCENTRAZIONE EMATICA DI MARKER INFIAMMATORI E DI OMOCISTEINA IN CANI CON PATOLOGIE GASTROENTERICHE SU BASE INFIAMMATORIA

<sup>1</sup>Rossi Gabriele, <sup>1</sup>Breda Sara, <sup>1</sup>Giordano Alessia, <sup>2</sup>Pengo Graziano, <sup>1</sup>Dall'Ara Paola, <sup>3</sup>Rossi Giacomo, <sup>1</sup>Paltrinieri Saverio

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano. <sup>2</sup>Clinica Veterinaria S. Antonio, Madignano (CR). <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Camerino (MC)

Molte patologie gastroenteriche sono caratterizzate dalla presenza di infiltrati infiammatori nello spessore della parete intestinale e determinano malassorbimento. Non è però noto, nel cane, se tali patologie siano associate a variazioni nella concentrazione ematica di marker infiammatori né se in questa specie possa verificarsi iperomocistemia (HHCy), conseguenza comune, nell'uomo di patologie caratterizzate da malassorbimento e fattore di rischio per malattie cardiovascolari.

Scopo di questo studio è verificare se cani con patologie gastroenteriche su base infiammatoria (iGID) siano associate a modificazioni delle concentrazioni sieriche dell'omocisteina (Hcy) o di marker infiammatori quali proteina C reattiva (CRP) o  $\alpha_2$ -globuline.

A questo scopo gli analiti sopra citati sono stati misurati nel sangue di 16 cani sani e di 17 cani con iGID confermata dalla biopsia intestinale che ha permesso di classificare le lesioni come infiammatorie. In questo gruppo sono stati formati sottogruppi sulla base della gravità dell'infiltrato infiammatorio, della localizzazione delle lesioni e della presenza di altre alterazioni di laboratorio compatibili con malassorbimento.

I risultati hanno evidenziato valori di CRP significativamente più elevati nei cani con iGID rispetto ai controlli, ma solo tre pazienti patologici mostravano valori superiori all'intervallo di riferimento. La concentrazione sierica di Hcy non era invece significativamente diversa nei due gruppi. L'analisi relativa ai diversi sottogruppi di animali con iGID non ha mai rilevato differenze significative.

In conclusione, a differenza che nell'uomo, la concentrazione sierica di Hcy o di indicatori ematici di flogosi non sembra avere un ruolo diagnostico o prognostico in patologie gastrointestinali su base infiammatoria.

**Parole chiave:** gastroenterologia, omocisteina, proteina C reattiva, elettroforesi delle sieroproteine.

### SERUM CONCENTRATION OF INFLAMMATORY BIOMARKERS AND OF HOMOCYSTEINE IN DOGS WITH INFLAMMATORY GASTROINTESTINAL DISORDERS

Several gastrointestinal disorders are characterized by inflammatory infiltrates within the intestinal wall and induce malabsorption. In dogs, however, it is not known whether these diseases are associated with changes in the serum concentration of inflammatory biomarkers or of homocysteine (Hcy). Hyperhomocysteinemia (HHCy) is a common consequence, in humans, of diseases associated with malabsorption and is a risk factor for cardiovascular diseases.

The aim of this study is to assess the possible presence of altered serum concentration of Hcy or of inflammatory biomarkers such as C reactive protein (CRP) or  $\alpha_2$ -globulins in dogs with inflammatory gastrointestinal diseases (iGID).

To this aim, the analytes mentioned above were measured in serum from 16 clinically healthy dogs and from 17 dogs with iGID confirmed by the detection of inflammatory lesions in gastrointestinal biopsies. Pathologic dogs were subgrouped on the basis of the severity of inflammatory infiltrates, on the localization of the lesions or on the presence of laboratory changes consistent with malabsorption.

CRP was found significantly higher in dogs with iGID compared with controls. However, only 3 pathologic dogs had CRP values higher than the reference ranges. Conversely, the serum concentration of Hcy recorded in the two groups did not show significant differences. No differences were found in the subgroups of dogs with iGID.

In conclusion, serum concentration of Hcy, CRP or  $\alpha_2$ -globulins does not have a diagnostic or prognostic role in inflammatory gastrointestinal disorders.

**Key words:** gastroenterology, homocysteine, C reactive protein, serum protein electrophoresis.

## **PENTALOGIA DI FALLOT IN UNA TIGRE SIBERIANA (*Panthera tigris altaica*) IN CATTIVITA'**

**Scaglione Frine Eleonora<sup>1</sup>, Tursi Massimiliano<sup>1</sup>, Chiappino Laura<sup>1</sup>, Schröder Cathrin<sup>2</sup>  
Triberti Orfeo<sup>2</sup>, Bollo Enrico<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).* <sup>2</sup>*Safaripark Pombia, SS 32 Km 23,4, 28050 Pombia (NO)*

A causa di un combattimento con conspecifici, un maschio di due anni di Tigre siberiana (*Panthera tigris altaica*) è deceduto ed è stato conferito al Dipartimento di Patologia Animale dell'Università degli Studi di Torino per l'esame autoptico. All'esame esterno l'animale si presentava in buono stato di nutrizione e le mucose non apparivano cianotiche. All'autopsia l'animale ha rivelato emorragie sottocutanee dovute ai morsi inflitti. I visceri apparivano congesti. Le tonsille e l'esofago erano edematosi. Si è rilevato inoltre catarro a livello dell'epiglottide. Il cuore appariva ingrandito e presentava le seguenti malformazioni: grave ipertrofia concentrica di entrambi i ventricoli, ampio difetto del setto interatriale, difetto del setto interventricolare, aorta a cavaliere, stenosi dell'arteria polmonare ed endocardiosi della valvola mitrale. Tali malformazioni sono riconducibili ad una rara patologia congenita denominata pentalogia di Fallot. Erano inoltre presenti emorragie gastriche e nefrite focale.

Basandosi su tali dati gli Autori concludono che la morte dell'animale sia dovuta ad insufficienza cardiaca acuta secondaria alla pentalogia di Fallot.

**Parole chiave:** cuore, malformazione, *Panthera tigris altaica*, pentalogia di Fallot, Tigre siberiana.

### **PENTALOGY OF FALLOT IN A CAPTIVE SIBERIAN TIGER (*Panthera tigris altaica*)**

A two-year-old male Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*) died during a fight with conspecific. On external examination the animal was in good body condition without presence of cyanosis. Subcutaneous haemorrhages were present, consistent with bite wounds. All viscera were congested. Tonsils and oesophagus appeared red and oedematous. Phlegm in the epiglottis was present. The heart appeared enlarged and had severe concentric hypertrophy of both ventricles, a large atrial septal defect, a membranous ventricular septal defect, over-riding of aorta, stenosis of pulmonary artery and endocardiosis of the mitral valve. Gastric haemorrhages and focal nephritis were also detected.

Based on these findings, we conclude that the death of the animal is due to acute cardiac failure secondary to multiple heart malformations consistent with pentalogy of Fallot. To our best knowledge this is the first report of a pentalogy of Fallot in tigers.

**Keywords:** heart, malformation, *Panthera tigris altaica*, pentalogy of Fallot, Siberian Tiger.

## SPLENITE GRANULOMATOSA DA *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* IN UN GATTO

Scarpa Filippo<sup>1</sup>, Galuppi Roberta<sup>1</sup>, Diana Alessia<sup>1</sup>, Michelon Davide<sup>2</sup>, Ghiotto Stefano<sup>1</sup>,  
Bettini Giuliano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO). <sup>2</sup>Libero Professionista, San Lazzaro di Savena (BO)

La criptococcosi è la più frequente micosi sistemica del gatto ed è sostenuta da lieviti capsulati del genere *Cryptococcus*. L'infezione, che solitamente si verifica attraverso inalazione di basidiospore, interessa principalmente le cavità nasali e può estendersi a sistema nervoso, occhio, linfonodi, cute e meno frequentemente ad altri organi. Viene descritto un inusuale caso di criptococcosi a localizzazione splenica in un gatto europeo maschio castrato di 3 anni. Il soggetto era presentato per disoressia ed episodi di costipazione; la visita clinica e gli esami ematobiochimici evidenziavano esclusivamente dimagrimento e una modica ipertermia (40°C). In seguito al riscontro ecografico di splenopatia diffusa di grado lieve veniva eseguito un prelievo citologico ecoguidato. Nei preparati, colorati con May-Grünwald Giemsa e successivamente con mucicarminio di Mayer, si osservavano numerosi microrganismi lievitiiformi circondati da una spessa capsula, con aspetti di gemmazione a base stretta, talora fagocitati da cellule epitelioidi e cellule giganti multinucleate. La diagnosi citologica di splenite granulomatosa a eziologia micotica era successivamente confermata dall'esame istologico condotto su campioni di milza asportata. Nelle sezioni istologiche erano presenti ampi focolai di infiammazione granulomatosa frammisti ad aree di tessuto "rarefatto" per la presenza di numerosi lieviti circondati da un'ampia capsula mucoide otticamente vuota che conferivano il caratteristico aspetto "a bolla di sapone". I microrganismi erano positivi alle colorazioni istochimiche PAS e Grocott e nei preparati colorati con mucicarminio di Mayer la capsula risultava intensamente colorata in rosa-rosso. L'esame colturale eseguito su Sabouraud dextrose agar addizionato di cloramfenicolo, ha permesso la crescita in purezza a 26°C e 37°C di colonie di lieviti le cui caratteristiche morfologiche, colturali e biochimiche erano indicative per *Cryptococcus neoformans*. Nonostante la terapia con itraconazolo, a distanza di due mesi il soggetto sviluppava distacco retinico. La terapia a base di cortisone, diuretici e fluconazolo determinava la completa remissione della sintomatologia oculare. A distanza di 18 mesi dalla diagnosi il soggetto, ancora sotto terapia antifungina per la persistenza di un elevato titolo antigenico, non presenta fenomeni di recrudescenza.

**Parole chiave:** splenite granulomatosa, gatto, micosi, criptococcosi, *Cryptococcus neoformans*.

## INTRODUZIONE

La criptococcosi è la più frequente micosi sistemica del gatto ed è sostenuta da lieviti capsulati del genere *Cryptococcus* (Trivedi *et al.*, 2011). L'infezione solitamente si verifica attraverso inalazione di spore presenti soprattutto nel terreno contaminato dalle deiezioni di piccione (Kerl, 2003; Trivedi *et al.*, 2011). Le sedi di infezione sono principalmente cavità nasali, sistema nervoso, occhio, linfonodi e cute; meno frequenti sono le localizzazioni ad altri organi quali osso e rene (Lambert *et al.*, 2006; Lorente-Méndez, 2009; Brandt e Blauvelt, 2010; Trivedi *et al.*, 2011). Viene di seguito descritto un inusuale caso di criptococcosi a localizzazione splenica.

## DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso presentato riguarda un gatto europeo maschio castrato di 3 anni, regolarmente vaccinato e FIV/FelV negativo, presentato per disoressia ed episodi di costipazione. La visita clinica evidenziava esclusivamente dimagrimento e modica ipertermia (40°C); non si riscontravano alterazioni emato-biochimiche. In seguito al rilievo ecografico di splenopatia diffusa di grado lieve veniva effettuato un prelievo citologico ecoguidato.

Nei preparati citologici colorati con May-Grünwald-Giemsa, accanto a elementi normalmente presenti nel parenchima splenico (globuli rossi, linfociti a diverso stadio di maturazione per lo più rappresentati da piccoli linfociti e cellule della linea monocito/macrofagica attivate) si osservavano numerosissimi microrganismi di forma da rotonda ad ovale, dimensioni di 8-20 µm, color azzurro-porpora e aspetto leggermente granuloso, circondati da una spessa capsula non colorata, liscia e omogenea, sia liberi che fagocitati da macrofagi epitelioidi e cellule giganti multinucleate (Fig. 1). Erano inoltre presenti rari granulociti neutrofili ed eosinofili.

Nei preparati colorati con mucicarminio di Mayer, la capsula risultava intensamente colorata in rosa-rosso e alcuni microrganismi mostravano gemmazioni a base stretta (Fig. 2). Sulla base di tali riscontri veniva formulata la diagnosi di splenite granulomatosa a eziologia micotica (*Cryptococcus* spp.).

La milza, asportata chirurgicamente, presentava in sezione lesioni granulomatose multifocali confluenti di colore biancastro e aspetto

gelatinoso (Fig. 3). Istologicamente il parenchima splenico era in gran parte sostituito da ampi focolai di infiammazione granulomatosa con il caratteristico aspetto "rarefatto", dovuto alla presenza di numerosissimi microrganismi, ciascuno circondato da un ampio alone otticamente vuoto all'ematossilina-eosina (c.d. aspetto "a bolle di sapone"), e alla scarsità di cellule infiammatorie rappresentate da macrofagi epitelioidi e cellule giganti multinucleate (Fig. 4). I microrganismi erano positivi alle colorazioni istochimiche PAS (Fig. 5b) e Grocott (Fig. 5c), e nei preparati colorati con mucicarminio di Mayer la capsula risultava intensamente colorata in rosa-rosso (Fig. 5d).

L'esame microscopico a fresco di impressioni del tessuto colorate con inchiostro di china hanno evidenziato la presenza di ammassi di cellule lieviti-formi gemmanti a base stretta, circondati da una spessa capsula non colorata. L'esame colturale, eseguito su Sabouraud Dextrose Agar addizionato di cloramfenicolo, ha permesso la crescita in purezza a 26°C e 37°C di colonie di lieviti le cui caratteristiche morfologiche, colturali e biochimiche (presenza di capsula, gemmazione a base stretta, crescita a 37°C, sensibilità all'actidione, positività al test dell'ureasi e profilo su API 20CAux - bioMérieux) erano indicative per *Cryptococcus neoformans*.

Dopo la splenectomia, il gatto è stato sottoposto a terapia con itraconazolo, ma a distanza di due mesi sviluppava distacco retinico. La sostituzione dell'itraconazolo con fluconazolo, un antimicotico in grado di raggiungere concentrazioni più elevate a livello oculare, e la somministrazione di cortisone e diuretici determinava la completa remissione della sintomatologia. A 18 mesi dalla diagnosi il soggetto, ancora in terapia per la persistenza di un elevato titolo antigenico, non presenta fenomeni di recrudescenza.

## DISCUSSIONE

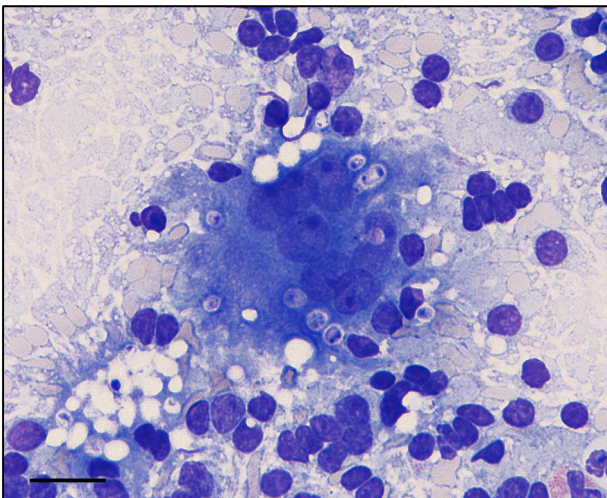
La criptococcosi è un'infezione piuttosto comune nel gatto. La particolarità di questo caso risiede nell'apparentemente esclusiva localizzazione splenica. Come riportato in letteratura (Trivedi *et al.*, 2011), l'inalazione di spore di *Cryptococcus* in un soggetto immunocompetente potrebbe aver determinato l'instaurarsi di una infezione asintomatica. Attraverso la via ematogena, i microrganismi potrebbero aver raggiunto il parenchima splenico localizzandosi all'interno

delle cellule del sistema reticolo-endoteliale dove, sfruttando la loro capacità di resistere alla fagocitosi, avrebbero cominciato a replicarsi. Una riduzione delle difese immunitarie potrebbe poi aver determinato una riacutizzazione dell'infezione.

Il trattamento di elezione della criptococcosi consiste nella somministrazione di antimicotici azolici (Trivedi *et al.*, 2011). Alla terapia medica può essere affiancata quella chirurgica in caso di lesioni localizzate, di grandi dimensioni e facilmente accessibili, considerato lo scarso potere di penetrazione degli agenti antifungini all'interno dei focolai granulomatosi (Trivedi *et al.*, 2011). In questo caso la comparsa di una sintomatologia oculare ha suggerito una possibile localizzazione uveale, confermata ex-iuvantibus dall'introduzione di un antimicotico in grado di raggiungere elevate concentrazioni a livello oculare.

## BIBLIOGRAFIA

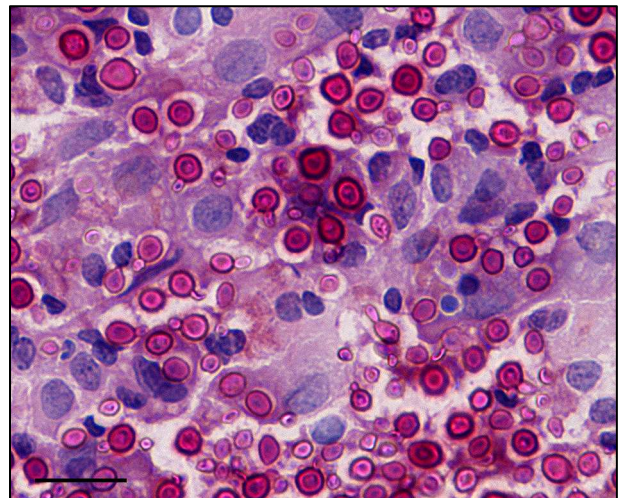
1. Brandt LE, Blauvelt MM. What is your diagnosis? Urine sediment from a southern



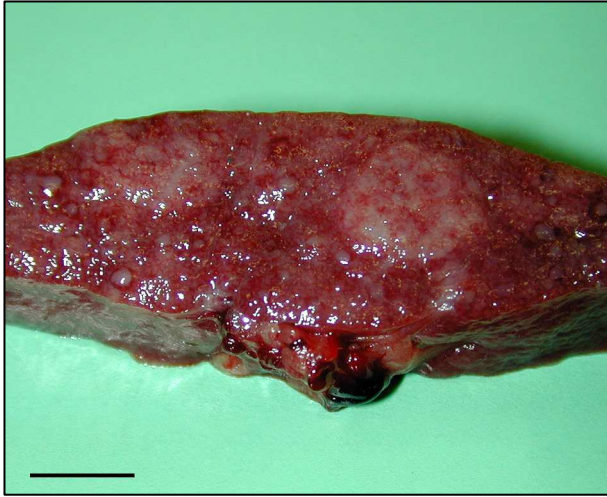
**Figura1** Agoaspirato splenico in cui sono visibili alcuni *Cryptococcus* fagocitati da una cellula gigante multinucleata, piccoli linfociti e globuli rossi. May-Grünwald-Giemsa, 40x, barra = 25  $\mu$ m.

California cat with weight loss. *Vet Clin Pathol* 2010; 39(4): 517-8

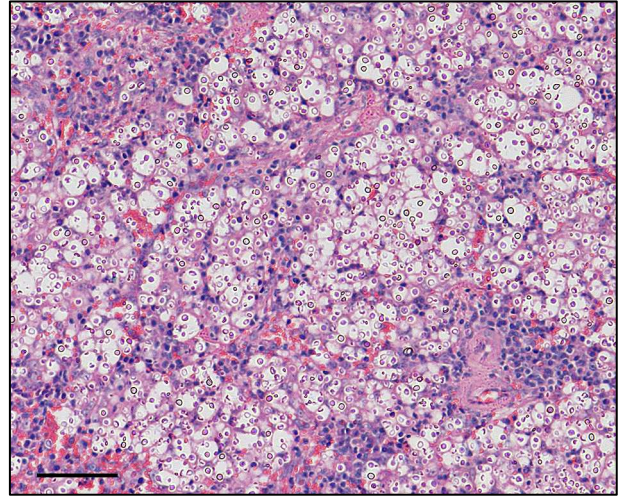
2. Kerl ME. Update on canine and feline fungal disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33(4): 721-47
3. Lambert RJ, Levin G, Wendelburg K, Huber M, Amann J, Bilbrey S; American College of Veterinary Radiology. What is your diagnosis? Cryptococcosis. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229(6): 931-2
4. Lorente-Méndez C, Martínez CM, Corpa JM. Pathology in practice. Systemic cryptococcosis caused by *C. neoformans* and concomitant severe pulmonary aelurostrongylosis. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 235(12): 1407-9
5. Trivedi SR, Malik R, Meyer W, Sykes JE. Feline cryptococcosis: impact of current research on clinical management. *J Feline Med Surg* 2011; 13(3): 163-72.



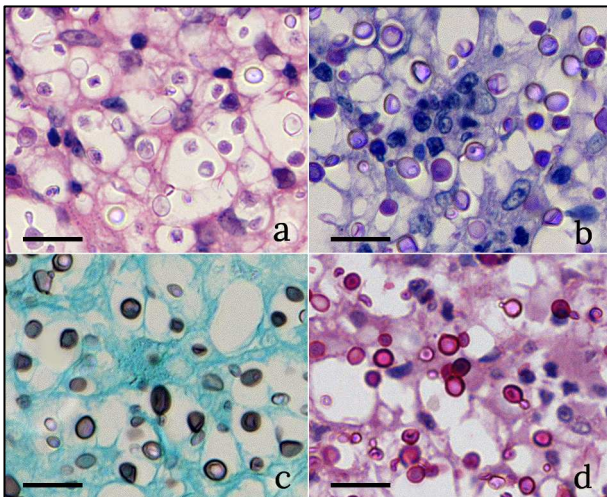
**Figura2** Numerosi *Cryptococcus* con capsula intensamente colorata in rosa-rosso e occasionali gemmazioni a base stretta. Mucicarminio di Mayer, 40x, barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 3** Milza, sezione. Lesioni multifocali confluenti di colore biancastro e aspetto gelatinoso. Barra = 5 mm.



**Figura 4** Milza. Estesi focolai di infiammazione granulomatosa con il caratteristico aspetto “rarefatto” o “a bolle di sapone”. Ematossilina-eosina, 10x, barra = 100 µm.



**Figura 5** Milza. Aspetto istologico dei lieviti di *Cryptococcus* a forte ingrandimento. Ematossilina-eosina (a), PAS (b), Grocott (c) e mucicarminio di Mayer (d), 40x, barra = 20 µm.

### GRANULOMATOUS SPLENITIS ASSOCIATED WITH *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* INFECTION IN A CAT

Cryptococcosis is the most common systemic fungal infection of domestic cats. We describe a case of severe granulomatous splenitis in a 3-year-old neutered male cat referred for dysorexia and constipation. Ultrasound examination of the abdomen revealed a mild diffuse splenic enlargement. Fine-needle aspirates of the spleen demonstrated numerous encapsulated yeast-like microorganisms with narrow-based budding. Histopathological and mycological examination of the surgically-removed spleen confirmed the cytological diagnosis of severe granulomatous splenitis associated with *Cryptococcus* spp.. Mayer's mucicarmine, PAS and Grocott histochemical stains were performed and resulted positive. Within two month, the patient developed retinal detachment, which resolved after treatment with corticosteroids, diuretics and fluconazole. Eighteen months later, the cat is still under treatment with antifungal agents and completely asymptomatic.

**Key words:** granulomatous splenitis, cat, mycosis, cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*.

# UN CASO DI PNST PREPUZIALE IN UN CAVALLO: STUDIO MORFOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO

**Sfacteria Alessandra, Perillo Laura, Rifici Claudia, Mazzullo Giuseppe**

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina*

In Medicina Veterinaria, con il termine “tumori della guaina dei nervi periferici” o PNST vengono comunemente indicati il neurofibroma e lo Schwannoma (o neurilemmoma) costituendo un gruppo eterogeneo di neoplasie, originanti dalle cellule di Schwann e/o dai fibroblasti perineurali, con aspetti clinici e patologici diversi. Per quanto riguarda la specie equina, e il cavallo in particolare, descrizioni di PNST a localizzazione cutanea e/o extracutanea sono state riportate da diversi autori. I PNSTs nel cavallo occorrono spesso sulle palpebre, a livello della regione del collo e delle ascelle; sono stati inoltre descritti a carico dello stomaco, del cieco, delle regioni della spalla, della faccia, del garretto e a sede intracranica. Per quanto concerne la localizzazione prepuziale, i dati bibliografici a nostra disposizione riportano unicamente la presenza, ma non la descrizione, di un caso di neurofibroma/sarcoma in questa regione del cavallo a livello penieno e prepuziale. Oggetto del nostro studio è un cavallo di razza Quarter horse, maschio, di 15 anni d'età che presentava diverse neoformazioni a livello prepuziale. Una di esse veniva asportata chirurgicamente e fissata in formalina tamponata al 10% e routinariamente inclusa in paraffina. Le sezioni istologiche venivano colorate con Ematossilina-Eosina e sottoposte ad indagine immunoistochimica utilizzando metodiche per S-100 e Vimentina al fine di caratterizzare l'origine delle cellule osservate. Le osservazioni istochimiche ed immunoistochimiche permettevano di attribuire la crescita neoplastica osservata ad un tipico tumore della guaina dei nervi periferici.

**Parole chiave:** PNST, neoplasie cutanee, neoplasie prepuziali, neoplasie genitali, cavallo.

## A CASE OF PREPUTIAL PNST IN A HORSE: MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

The term of peripheral nerve sheath tumours (PNSTs) has been used for neoplasms such as schwannoma and neurofibroma. In the equine species, and particularly in the horse, descriptions of skin and / or extracutaneous locations of PNST have been reported by several authors. The PNSTs in the horse involve eyelids, neck and armpits; they have been also described in stomach, cecum, shoulder regions, face, hock and intracranial site. Regarding the preputial location, bibliographic data show only the presence but not the description, of a case of neurofibroma / sarcoma in penile and preputial region. A male, 15 y.o. Quarter horse showed several preputial neoformations. One of them was surgically removed, fixed in 10% buffered formalin and routinely processed. Histological sections were stained with Haematoxylin-Eosin and for S-100 and Vimentin immunohistochemistry reactions. All data were supportive of a diagnosis of PNST.

**Key words:** PNST, skin neoplasms, preputial tumours, genital tumours, horse.

## CARATTERIZZAZIONE DI LESIONI GRANULOMATOSE IN UNA POPOLAZIONE DI CEFALI DEL MAR LIGURE ORIENTALE

Varello Katia, Prearo Marino, Serracca Laura, Giorgi Ilaria, Audino Valentina, Righetti Marzia, Pezzolato Marzia, Ercolini Carlo, Bozzetta Elena

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

*Mycobacterium* spp. e *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* sono riconosciute come le principali cause di lesioni granulomatose nei pesci.

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la diffusione delle infezioni da *Mycobacterium* spp. in una popolazione di cefali del Mar Ligure orientale e di effettuare una diagnosi differenziale con quelle da *P. damsela* ssp. *piscicida*

Centocinquantanove cefali (*Mugil cephalus* e *Liza* spp.) sono stati pescati e sottoposti ad esame necroscopico per evidenziare la presenza di lesioni. Porzioni di fegato e milza sono state campionate e sottoposte ad esame istopatologico mediante colorazioni Ematossilina-Eosina (EE) e Ziehl-Neelsen (ZN), a esame colturale per *Mycobacterium* spp e PCR per *P. damsela* ssp. *piscicida*.

All'esame necroscopico un solo animale presentava lesioni granulomatose. All'esame istologico sono stati riscontrati granulomi singoli o multipli in 67 dei soggetti analizzati (42,14%) con lesioni a diverso stadio di evoluzione. Trentuno di questi sono risultati positivi alla ZN con conferma dell'esame colturale. Cinquantasei soggetti (35%) sono risultati positivi per *P. damsela* ssp. *piscicida* di cui 30 senza il riscontro di granulomatose, 20 con granulomi ZN positivi e 6 con granulomi ZN negativi.

Questi dati evidenziano come le infezioni da micobatteri atipici siano presenti in specie ittiche selvatiche. Nel caso dei campioni con granulomi senza positività agli esami colturale e PCR si può ipotizzare che si tratti di lesioni da fotobatteriosi in uno stadio avanzato di evoluzione. A questo riguardo infatti bisogna sottolineare come i quadri istopatologici si presentassero a diverso grado di sviluppo.

L'identificazione in un numero elevato di soggetti di *P. damsela* ssp. *piscicida* dimostra la diffusione di questo batterio nei cefali nel Mar Ligure anche se con un minore riscontro di lesioni granulomatose.

**Parole chiave:** cefali, lesioni granulomatose, *Mycobacterium* spp., *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*.

## CHARACTERIZATION OF GRANULOMATOUS LESIONS IN WILD GREY MULLET POPULATION FROM EASTERN LIGURIAN SEA

*Mycobacterium* spp. and *P. damsela* ssp. *piscicida* are recognized as more frequent causes of granulomatous lesion in fish.

The aim of this work is to investigate the spread of mycobacterial infections in wild grey mullets population from Eastern Ligurian Sea and to perform a differential diagnosis with lesions related to *P. damsela* ssp. *piscicida* infection .

One hundred fifty-nine fish (*Mugil cephalus* and *Liza* spp.) were fished and necropsied in order to investigate the presence of lesions. Samples from liver and spleen were collected from all fish for histopathological (EE), histochemical (ZN) and microbiological examinations for *Mycobacterium* spp and molecular analysis for *P. damsela* ssp. *piscicida*.

At gross examination only in one animal granulomatous lesions were observed. Microscopically, 67 animals (42,14%) displayed granulomas at different evolution stages, partly positive at ZN (31) and confirmed by microbiological examination. Fifty-six animals (35%) resulted positive for *P. damsela* ssp. *piscicida*.

These data suggest that mycobacterial infections in wild fishes are widely diffused like so that caused by *P. damsela* ssp. *piscicida*. Granulomatous lesions without cultural or PCR positivity suggests that they are related to a chronic stage of Photobacteriosis, supported by the identification of granulomas at different evolution stages at histopathological examination.

**Key words:** wild grey mullet, granulomatous lesions, *Mycobacterium* spp., *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*.