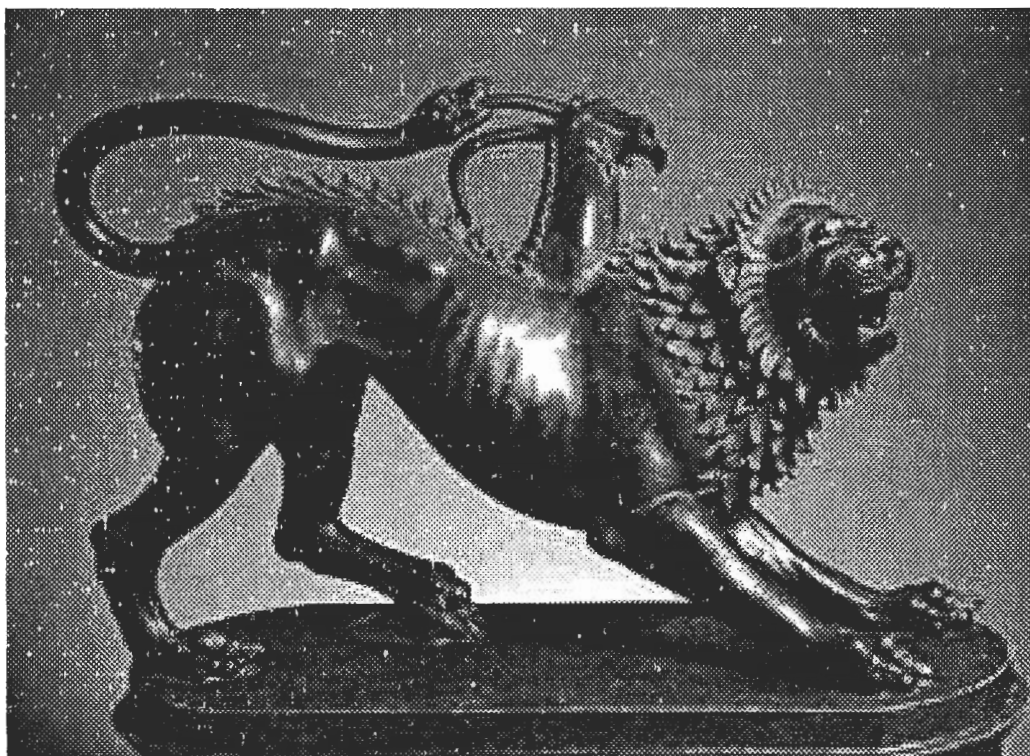


A.P.I.V.  
ASSOCIAZIONE PATOLOGI ITALIANI VETERINARI

# ATTI XV CONVEGNO NAZIONALE

(Hotel Minerva AREZZO, 12-13-14 aprile 1996)



BANCA POPOLARE DELL'ETRURIA E DEL LAZIO

**ATTI MEETING APIV PRIMAVERILE 1996  
AREZZO, 12-14 APRILE 1996**

**ELENCO DELLE COMUNICAZIONI ORALI**

Sezione: MIOPATIE DEL CANE E DEL CAVALLO

IL RUOLO DELLE TECNICHE ISTOLOGICHE, ISTOENZIMATICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI DEL CAVALLO E DEL CANE Cantoni A.M., Di Lecce R., Corradi A. ....	5
LA DISTROFIA MUSCOLARE TIPO DUCHENNE-BECKER. ASPETTI COMPARATI Papparella S. ....	21
SISTEMA COLTURALE TRIDIMENSIONALE PER LO STUDIO DELLA PATOLOGIA CARTILAGINEA IN VITRO Borghetti P., Della Salda L., De Angelis E. ....	33
NEOPLASIA EPATICA SECONDARIA NEL BOVINO Bertollo F.M. ....	43

Sezione: ARGOMENTI DI PATOLOGIA GENERALE

RUOLO BIOLOGICO DELLE MOLECOLE DI ADESIONE Galeotti M. ....	49
IL DANNO PROTEICO OSSIDATIVO COME MECCANISMO DI MORTE CELLULARE NELL'IMMUNODEFICIENZA DI ORIGINE LENTIVIRALE Piedimonte G. ....	63
DISTRIBUZIONE DEL DNA PROVIRALE DEL VIRUS MAEDI-VISNA IN POLMONI NATURALMENTE INFETTI Sanna E., Woodall C., Leoni A., Nieddu A.M., Pirino S. ....	67
INDAGINE PRELIMINARE SULL'ADERENZA DI GRANULOCITI NEUTROFILI DI CANE IN CORSO DI NEOPLASIE DEL SISTEMA EMATOPOIETICO Paltrinieri S., Sartorelli P. ....	75
CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO ISTOLESIVO ED IMMUNOLOCALIZZAZIONE DELLA PRPSC IN CASI NATURALI DI SCRAPIE OVINA Agrimi U., Di Guardo G., Eleni C., Marcon S., Di Bari M.A., Ligios C., Fazzi P., Cardone F., Pocchiari M. ....	79

Sezione: VIGILANZA VETERINARIA SUI PRODOTTI A BASE DI CARNE

VIGILANZA VETERINARIA SUI PRODOTTI BASE DI CARNE ALLE SOGLIE DEL TERZO MILLENNIO Rosmini R. ....	95
Sezione: DERMOPATOLOGIA DEL FOLLICOLO PILIFERO	

PATOLOGIA ATROFICA E DISPLASTICA DEL FOLLICOLO PILIFERO Della Salda L. ....	105
PATOLOGIE INFIAMMATORIE DEL FOLLICOLO PILIFERO NEL CANE E NEL GATTO Mechelli L. ....	125
COLOR DILUTION ALOPECIA (CDA) NEL CANE Maiolino P. ....	133
CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DEL PILOMATRICOMA NEL CANE: INDAGINE SU 45 CASI Caramelli M., Casalone C., Castagnaro M. ....	135
VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELL'ESPRESSIONE DI CADHERINA E IN CARCINOMI SQUAMOSI, CARCINOMI BASOSQUAMOSI E BASALIOMI CUTANEI DI CANE Riccaboni P., Sironi G. ....	143

# **IL RUOLO DELLE TECNICHE ISTOLOGICHE, ISTOENZIMATICHE ED IMMUNOISTOCHIMICHE NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI DEL CAVALLO E DEL CANE**

**CANTONI A.M., DI LECCE R., CORRADI A.**

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria  
Università degli Studi di Parma*

Il normale funzionamento del muscolo condiziona il coordinamento dei movimenti e della la postura e dipende dall'azione sinergica di strutture anatomiche diverse quali le fibre muscolari, la giunzione neuromuscolare ed il motoneurone composto da un corpo cellulare e da un assone che si estende lungo il nervo periferico.

Uno squilibrio morfofunzionale nei rapporti di queste strutture anatomiche determina, come segno clinico primario, un indebolimento muscolare, evidente tanto nelle patologie di origine neurogena che in quelle di origine miogena.

La diagnosi delle malattie neuromuscolari si avvale di esami anamnestici (nel cane alcune miopatie sono specifiche di determinate razze) e clinici accurati, di test ematologici e biochimici (in cui si valuta l'attività di diversi enzimi sierici del muscolo) ed elettromiografici, ma spesso la biopsia muscolare diventa un mezzo indispensabile per confermare o differenziare il tipo di affezione muscolare.

Com'è noto la biopsia muscolare è una procedura relativamente semplice e di grande aiuto nella diagnostica della patologia neuromuscolare, sia in campo umano che veterinario (23).

Nel cavallo e nel cane lo studio del muscolo scheletrico prelevato biotticamente permette di rilevare se un'atrofia muscolare progressiva sia primitiva o secondaria ad un danno nervoso periferico:

- di determinare l'entità e la gravità del danno muscolare nelle miositi, nella rabdomiolisi e nelle miopatie da decubito;
- di valutare se l'incremento dei diametri fibrili dipenda dall'esercizio o da una condizione miopatica;
- di identificare l'eventuale deficit metabolico specifico di un muscolo;
- di diagnosticare le malattie del tessuto connettivo e dei vasi sanguigni;
- di individuare le future potenzialità atletiche dell'animale, determinando le percentuali dei tipi di fibre che compongono diversi muscoli scheletrici (3, 24).

La scelta del muscolo da sottoporre a biopsia si basa sulla distribuzione della debolezza muscolare e sull'estensione dell'atrofia e segue alcuni criteri (3, 24):

- 1) Il muscolo deve essere affetto da una patologia neuromuscolare, anche se non deve essere totalmente atrofico o gravemente interessato da processi flogistici acuti, poichè in tali condizioni difficilmente si possono avere utili informazioni diagnostiche;

- 2) il prelievo bioptico va eseguito in una zona dove non vi siano grossi vasi sanguigni, nervi periferici, tendini o giunture;
- 3) I campioni devono essere prelevati da muscoli per i quali sono noti valori morfometrici di riferimento;
- 4) Il campione bioptico dovrebbe essere prelevato sempre nella stessa regione anatomica, essendo documentato come, nel cavallo e nel cane, la distribuzione delle fibre muscolari vari all'interno dello stesso muscolo, passando da una zona superficiale ad una più profonda (27);
- 6) Il prelievo non deve causare grossi disagi post-operatori.

Nel cavallo sono sottoposti a biopsia il m. gluteo medio, il m. bicipite femorale, il m. semimembranoso, il m. semitendinoso ed il m. tricipite brachiale, quando sono colpiti da malattie neuromuscolari i muscoli prossimali degli arti toracico e pelvico, mentre se sono interessati i muscoli distali che flettono ed estendono gli arti, sono più facilmente aggredibili il m. estensore radiale del carpo e il m. estensore lungo delle dita (4).

Nel cane la maggior parte dei muscoli degli arti e della testa sono facilmente accessibili per un prelievo bioptico e solitamente vengono prelevati quei muscoli per i quali sono disponibili dei dati qualitativi e quantitativi di riferimento (12).

Nell'arto pelvico vengono prelevati di preferenza i muscoli bicipite femorale e vasto laterale nel terzo distale; il capo laterale del m. gastrocnemio ed il m. tibiale craniale a livello del terzo prossimale.

Nell'arto toracico invece il capo lungo e il capo mediale del tricipite brachiale vanno prelevati nel terzo distale, mentre il m. flessore superficiale delle dita viene prelevato prossimalmente (24).

Nel cavallo i prelievi bioptici muscolari sono effettuati soprattutto per via percutanea, utilizzando l'ago da biopsia ideato da Bergstrom nel 1962 (1).

Questa tecnica permette, praticando solo una piccola incisione della cute e delle fasce sottostanti, di introdurre nel muscolo l'ago da biopsia e dopo aver applicato una certa pressione, di prelevare parallelamente alle fibre muscolari, piccole porzioni di tessuto muscolare (3 mm di diametro ed 1 cm di lunghezza). Questo metodo è semplice, rapido e la guarigione della ferita avviene in pochi giorni senza complicazioni locali (2, 6).

Nel cane è preferibile praticare la biopsia muscolare con la tecnica a "cielo aperto", in anestesia generale, dopo aver effettuato le prove elettrodiagnostiche (elettromiografia e determinazione della velocità di conduzione del nervo) e per evitare artefatti, il campione va prelevato nelle zone in cui non sono posizionati gli elettrodi (24).

La sede bioptica, dopo essere stata preparata chirurgicamente, viene incisa per 5-6 cm, separando pelle e fasce sottostanti per esporre il muscolo. Afferrato con pinze il segmento di muscolo, si preleva un campione cilindrico (approssimativamente di 1.5 cm di lunghezza, 1 cm di larghezza e di 1 cm di spessore, con fibre orientate longitudinalmente attraverso la lunghezza del cilindro). Effettuato il prelievo si suturano le fasce e la cute.

Non devono essere applicate delle tecniche particolari per tenere il campione muscolare in tensione per l'istologia di routine e per l'istoenzimologia, mentre è molto importante una leggera tensione per la microscopia elettronica (per questo scopo vanno usate delle speciali pinze per la biopsia) (7).

In contrasto con la biopsia per via percutanea, la tecnica bioptica a “cielo aperto” è più idonea per un adeguato campionamento di tessuto muscolare e facilita le procedure di congelamento e sezionamento (3).

I campioni bioptici dopo il prelievo vanno coperti con garza inumidita con soluzione fisiologica e per evitare la perdita di enzimi solubili, devono essere congelati entro un'ora dal prelievo; tuttavia, nei campioni refrigerati si mantengono invariate per almeno 12-24 ore le proprietà cito e istoenzimatiche.

I frammenti bioptici, posti su fette sottili di sughero ed orientati per essere sezionati nei piani trasversali e longitudinali, sono congelati attraverso l'immersione in isopentano raffreddato a  $-170^{\circ}\text{C}$  in azoto liquido, per diversi secondi (30 sec-1 min.); questo evita la formazione di macro cristalli di ghiaccio e consente di mantenere una struttura morfologica simile a quella presente in vivo; inoltre vengono preservate le attività enzimatiche, che potranno essere evidenziate e studiate.

Il frammento bioptico può essere avviato immediatamente alle indagini istologiche, istoenzimatiche, immunoistochimiche ed anche ultrastrutturali o conservato per lungo tempo in un congelatore a  $-80^{\circ}\text{C}$  (26).

## **METODI ISTOLOGICI ED ISTOCHIMICI**

Le colorazioni istologiche maggiormente utilizzate su sezioni criostatiche per evidenziare la morfologia del tessuto muscolare, sono l'ematossilina-eosina, la tricromica modificata di Gomori e la Verhoeff-Van Gieson (11).

Queste colorazioni mostrano la struttura delle fibre muscolari, del tessuto connettivo, dei vasi sanguigni e dei nervi.

La tricromica modificata di Gomori differenzia le fibre muscolari, il tessuto connettivo e le componenti vascolari e nervose, evidenziando alterazioni patologiche a carico di queste strutture. Inoltre con questa colorazione istologica è già possibile distinguere due tipi di fibre muscolari, essendo le fibre di tipo I caratterizzate da una colorazione di fondo leggermente più scura, che rappresenta la rete intermiofibrillare (10).

La Verhoeff-Van Gieson evidenzia non solo il tessuto connettivo interfibrillare, ma anche la mielina dei nervi periferici e l'elastina dei vasi, mentre i mitocondri e la rete intermiofibrillare appaiono visibili nelle sezioni trasversali come una fine punteggiatura nera (11).

Per studiare il substrato energetico utilizzato dal muscolo per l'attività contrattile, si applicano colorazioni istochimiche che evidenziano i lipidi ed i glucidi della fibra muscolare.

Con il Sudan black B o l'Oil Red O si possono evidenziare modificazioni del contenuto lipidico intrafibrillare in aumento nella miastenia grave, nella miopatia corticosteroidica, nella neuromiopia diabetica e nella miopatia da deficit di carnitina.

Con la PAS reazione si valuta il contenuto glicidico delle fibre muscolari, che appare aumentato nelle glicogenosi muscolari o deficitario nelle miopatie ereditarie metaboliche (27).

## **METODI ISTOENZIMATICI**

L'impiego routinario delle tecniche istoenzimatiche nello studio del muscolo prelevato biotticamente si è rilevato di estrema importanza per un corretto inquadramento diagnostico delle patologie neuromuscolari dell'uomo e degli animali domestici (13, 15, 26).

I metodi istoenzimatici permettono un'analisi approfondita di alcuni parametri anatomo-funzionali dell'unità motoria non evidenziabili con i metodi istologici:

- a) determinazione dei diametri dell'uno o dell'altro tipo fibrale, che possono essere alterati in diversi quadri morbosi;
- b) determinazioni quantitative nei riguardi del rapporto numerico fra i vari tipi di fibre;
- c) analisi della organizzazione topografica delle fibre muscolari per valutare la fisiologica distribuzione a mosaico delle fibre, che può essere alterata in svariate affezioni muscolari;
- d) evidenziazione di cambi strutturali del muscolo non evidenziabili con metodi istologici.

Gli enzimi di maggior interesse nello studio del tessuto muscolare sono quelli connessi con la glicogenosintesi e la glicogenolisi come la fosfofruttochinasi e la fosforilasi; le ossidoreduttasi (diverse deidrogenasi legate al ciclo di Krebs) e le idrolasi (adenosintrifosfatasi) e varie esterasi (11).

La fosforilasi è un enzima citoplasmatico che regola il metabolismo del glicogeno, infatti stacca una molecola di glucosio dal glicogeno sotto forma fosforilata, già pronta per essere utilizzata in varie vie metaboliche. Nelle sezioni criostatiche è possibile svelare l'eventuale assenza di questo enzima, quando si osservano accumuli di materiale PAS positivo a livello della regione subsarcolemmale delle fibre muscolari.

Le ossidoreduttasi comprendono un gruppo esteso di enzimi che catalizzano l'ossidazione di vari substrati producendo energia per il metabolismo cellulare e tissutale.

Il principio delle tecniche istoenzimatiche per le deidrogenasi è l'uso di un colorante solubile (il nitroblutetrazolio) che intercetta l'idrogeno in alcuni punti lungo la catena respiratoria ed è ridotto ad un colore più profondo, producendo formazioni insolubili, che si depositano dov'è il sito dell'attività enzimatica.

Tra gli enzimi ossidativi assumono particolare importanza: la succinodeidrogenasi (SDH) enzima puramente mitocondriale, entra nel ciclo di Krebs ed il suo rilievo è un indice della sua attività; la tetrazolio-reduttasi (NADH-TR: nicotin-adenin-dinucleotide tetrazolio-reduttasi), presente nei mitocondri e nel reticolo endoplasmatico dove si trova solidamente ancorata.

Lo studio di queste attività enzimatiche permette di differenziare le fibre di tipo I, che reagiscono intensamente, le fibre di tipo IIA con una attività intermedia, mentre le fibre di tipo IIB presentano una debole reattività. La caratteristica distribuzione reticolare di questi enzimi può apparire scompagnata sia nelle miopatie primitive, che in quelle secondarie.

Al gruppo delle idrolasi appartengono diverse ATPasi presenti nei tessuti animali, che differiscono non solo per la loro localizzazione, ma anche per le loro proprietà biochimiche e che sono responsabili della degradazione fisiologica dell'ATP.

Il rilievo dell'ATPasi miofibrillare calcio dipendente è di fondamentale importanza per l'identificazione e la classificazione dei tipi di fibre muscolari che compongono i muscoli scheletrici sia dell'uomo che degli animali.

Basandosi sull'attività dell'ATPasi miofibrillare, Engel sostenne un sistema di due tipi fibrili (10):

- FIBRE di TIPO I o fibre rosse, a contrazione lenta, ad alto contenuto in mioglobina, resistenti allo sforzo protratto, con numerosi mitocondri ed un'elevata attività per gli enzimi ossidativi; ricche in lipidi, con poco glicogeno e scarsa attività fosforilasi.

- FIBRE di TIPO II o fibre bianche, a contrazione rapida, scarsamente resistenti alla fatica, con una ridotta attività enzimatica ossidativa ed un'elevata attività per l'ATPasi miofibrillare, contengono molto glicogeno e pochi lipidi.

Brooke e Kaiser, in base alla lability dell'ATPasi miofibrillare a diversi pH, differenziarono le diverse forme intermedie che si pongono tra le fibre di tipo I e di tipo II (10):

- FIBRE di TIPO IIA, glicolitiche ed ossidative, con caratteristiche fisiologiche e metaboliche intermedie tra le fibre di tipo I e IIB;

- FIBRE di TIPO IIB, con proprietà esclusivamente glicolitiche;

- FIBRE di TIPO IIC, ritenute fibre ancora immature capaci di differenziarsi in fibre di tipo IIA o IIB, presenti nel muscolo neonatale ed in percentuali < al 2% nel muscolo degli animali adulti.

Con l'ATPasi miofibrillare a pH 9,4 le fibre di tipo I hanno una bassa attività ATPasica ed appaiono chiare, mentre le fibre di tipo II, presentando un'alta attività ATPasica, si colorano intensamente; previa incubazione a pH 4,3 si ha una completa inversione del pattern enzimatico per cui le fibre di tipo II risultano chiare e le tipo I sono scure.

Per la ricerca dei sottotipi si fa ricorso alla stessa tecnica, previa incubazione a diversi pH acidi (da pH 4,5 a 3,9); in questo modo le fibre di tipo I mostrano una forte attività ATPasica, mentre le tipo II si differenziano in fibre di tipo IIA a debole attività ATPasica e fibre di tipo IIB ad attività ATPasica intermedia; a pH 3,9 infine si evidenziano solo le fibre di tipo IIC (11).

Nei muscoli scheletrici del cavallo, sono stati identificati, con le metodiche per l'ATPasi miofibrillare e degli enzimi ossidativi, due popolazioni fibrili (fibre di tipo I e fibre di tipo II) e tre sottotipi fibrili (IIA, IIB e IIC) (4, 5, 6, 9).

Nel cane i muscoli prossimali e distali degli arti sono costituiti soprattutto da fibre di tipo I, IIA e in percentuale inferiore da fibre di tipo IIC, mentre è ancora discussa la presenza di fibre di tipo IIB (12, 13, 20).

Nei muscoli della testa del cane (masseteri e temporali), innervati da branche del nervo trigemino, sono stati individuati due tipi di fibre muscolari, che evidenziano diverse caratteristiche contrattili ed istoenzimatiche:

a) Fibre di tipo IIM, con attività ATPasica stabile sia a pH acido che alcalino. Hanno proprietà di colorazione simili a quelle delle fibre di tipo IIC, ma con maggior stabilità a pH acido.

b) Una variante delle fibre di tipo I con attività ATPasica parzialmente reversibile dopo preincubazione in mezzo acido (14, 21).

## **ALTERAZIONI DEL TESSUTO MUSCOLARE EVIDENZIABILI CON I METODI ISTOLOGICI**

In risposta agli stati patologici nel muscolo scheletrico si possono osservare dei cambiamenti istologici nelle fibre muscolari e nel tessuto connettivo quali:

**NECROSI e FAGOCITOSI:** sono il risultato di numerosi processi patologici. Sono frequenti nelle distrofie muscolari, ma possono esprimere anche processi infiammatori (polimiosite), o alterazioni metaboliche (deficit enzimatici congeniti)

**ATROFIA:** si ha quando le fibre muscolari sono denervate, o non usate o private del loro apporto sanguigno. L'atrofia più marcata consegue alla denervazione, in cui le fibre si presentano di dimensioni ridotte e con profili angolati. La distribuzione delle fibre atrofiche nel tessuto muscolare consente di differenziare le miopatie primarie da quelle neurogene; nel primo caso la distribuzione delle fibre atrofiche è causale, nel secondo le fibre atrofiche appaiono raggruppate.

**IPERTROFIA:** nella miotonia congenita si osserva ipertrofia delle fibre di tipo I. Nell'animale atleta l'ipertrofia è diffusa a tutti i tipi di fibre. Nelle distrofie muscolari fibre muscolari ipertrofiche sono frammiste a fibre atrofiche.

**"SPLITTING" O DIVISIONE LONGITUDINALE delle FIBRE MUSCOLARI:** per rigenerazione difettosa delle fibre muscolari o per suddivisione di fibre ipertrofiche.

**FIBRE BASOFILE:** sono fibre rigenerate, basofile con nuclei vescicolosi.

**FIBRE con NUCLEI CENTRALI:** normalmente i nuclei sono localizzati alla periferia della fibra e solo un 2-3% delle fibre presentano nuclei centrali. Questo reperto diventa patologico quando un'alta percentuale di fibre presenta nuclei centralizzati.

**INFILTRATI CELLULARI:** si osservano nelle miositi idiopatiche autoimmuni, nel corso di patologie infettive o nelle distrofie muscolari.

**CISTI PARASSITARIE:** nelle fibre muscolari si possono reperire cisti intrafibrili nel corso di malattie parassitarie sostenute da sarcosporidi spp, da toxoplasma spp, da neospora caninum, ecc.

**FIBROSI endomisiale e perimisiale e l'INFILTRAZIONE ADIPOSA:** si osservano in tutti i processi patologici che comportano una distruzione delle fibre muscolari (per es. nella miopatia dei muscoli masticatori del cane o nelle distrofie muscolari).

## **ALTERAZIONI DELLE FIBRE MUSCOLARI EVIDENZIABILI CON I METODI ISTOENZIMATICI**

Con i metodi istochimici ed istoenzimatici è possibile evidenziare:

**DEFICIT di FIBRE di TIPO I o II:** nella distrofia muscolare del Labrador o nelle miopatie endocrine (18).

**ATROFIA delle FIBRE di TIPO I,** nell'atrofia da disuso (24).

**ATROFIA delle FIBRE DI TIPO II:** nelle miopatie secondarie ad ipotiroidismo e ad ipercorticossurrenalismo (16)

**RAGGRUPPAMENTO dei TIPI FIBRALI:** caratterizza processi di denervazione e di reinnervazione.

**FIBRE con strutture bastoncellari (RODS)** in sede subsarcolemmale, fibre con un vuoto enzimatico al centro (**CENTRAL CORE**), fibre bersaglio (**TARGET FIBRES**) osservabili generalmente nelle miopatie neurogene, per fenomeni di reinnervazione.

**DEFICIT ENZIMATICI:** caratterizzano miopatie dismetaboliche e miopatie mitocondriali (25).

## **MORFOMETRIA**

Attraverso un analizzatore di immagini si possono determinare le aree, le percentuali ed i diametri dei tipi fibrali. Questi fattori possono variare nello stesso muscolo e tra i muscoli scheletrici dello stesso animale.

Sono stati definiti valori morfometrici normali in diversi muscoli scheletrici del cane e del cavallo, che permettono di identificare le alterazioni che compaiono in seguito a condizioni patologiche (3, 9, 13, 24).

**MODIFICAZIONI DEL DIAMETRO MEDIO:** sono state evidenziate nel cavallo e nel cane variazioni dei valori diametrali medi dei diversi tipi fibrali correlati all'età, alla razza, al peso dell'animale e negli animali atleti al tipo di allenamento (5). Nel cane il diametro fibrile medio dei muscoli degli arti è di 40-50 micron per cani di peso superiore a 15 Kg e di 30-40 micron nei cani di peso inferiore ai 15 Kg (12).

Nel cavallo l'allenamento induce un aumento dei diametri fibrali e delle aree delle fibre muscolari (8)

**PERCENTUALE DEI TIPI DI FIBRA,** è determinata da una conta di circa 200-600 fibre nelle sezioni trasversali. E' stato accertato che nel cane le fibre di tipo I predominano nel capo mediale dei muscoli tricipite brachiale e flessore superficiale delle dita, mentre quelle di tipo II nel bicipite femorale, nel capo lungo del tricipite brachiale e nel tibiale craniale. Nei muscoli laringei e nel muscolo buccinatore, predominano le fibre di tipo II (17).

**PERCENTUALE DEI NUCLEI CENTRALI,** deve essere definita da una conta di circa 200-600 fibre nelle sezioni trasversali. Il numero di fibre con nuclei centrali, nel cane, generalmente non supera l'1% nei muscoli normali degli arti, in quelli laringei e facciali, mentre è dell'8-12% nel muscolo striato esofageo (24).

L'aumento del numero dei nuclei interni si riscontra nella miopatia ereditaria del Labrador, nelle miopatie miotoniche dei cani e dei cavalli (3, 25).

**FATTORI DI ATROFIA E DI IPERTROFIA:** questi fattori derivano dagli istogrammi ed esprimono il numero di fibre muscolari di diametro inferiore o superiore ai valori di normalità, vengono utilizzati per determinare la presenza di atrofia o di ipertrofia muscolare non evidenziabile con un'analisi microscopica non oggettivata da indagine morfometrica (24).

Le indagini **IMMUNOISTOCHEMICHE** sono effettuate soprattutto nella diagnosi delle miopatie di origine autoimmune o delle distrofie muscolari ereditarie quali (24):

- la **MIOSITE** dei Muscoli **MASTICATORI** del cane, in cui si evidenziano depositi di IgG a livello di fibre di tipo IIM (21);
- la **MIASTENIA GRAVE ACQUISITA** del cane, dove è possibile localizzare immunocomplessi a livello di giunzione neuromuscolare (19);
- la **POLIMIOSITE** del cane, in cui sono stati dimostrati depositi di immunoglobuline nella membrana sarcolemmale (20);
- la **DISTROFIA MUSCOLARE DEL CANE** associata al cromosoma X, con la dimostrazione immunostochimica del deficit di distrofina a livello del sarcolemma (22).

Inoltre sono in via di sviluppo tecniche analitiche biochimiche per l'identificazione, la purificazione e l'isolamento di diversi enzimi, proteine, lipidi, elettroliti nel muscolo e nei nervi. Questi studi permetteranno di applicare procedure microanalitiche alle analisi di routine dei campioni biotici muscolari.

Per concludere possiamo dire che le valutazioni istologiche, istoenzimatiche ed immunostochimiche e se del caso ultrastrutturali, permettono di addivenire più correttamente e facilmente alla formulazione di una diagnosi di patologia neuromuscolare, alla quale potrà attingere il medico veterinario curante per una terapia mirata e per una più corretta valutazione prognostica.

## **LE MIOPATIE DEL CANE**

### **MIOSITI**

- a) **INFETTIVE** ( Clostridi spp, Streptococchi spp, Stafilococchi spp, Leptospira spp, Virus )
- b) **PARASSITARIE** ( Toxoplasma spp, Neospora caninum, Hepatozoon, ecc.)
- c) **IMMUNOMEDIATE**

**MIOSITE DEI MUSCOLI MASTICATORI** (eosinoflica o atrofica)  
**POLIMIOSITE**  
**DERMATOMIOSITE**  
**MIASTENIA GRAVE ACQUISITA**

### **MIOPATIE EREDITARIE O CONGENITE**

**DISTROFIA MUSCOLARE DEL GOLDEN RETRIEVERS**  
**MIOPATIA DEL LABRADOR RETRIEVERS**  
**MIOTONIA CONGENITA**  
**MIOTONIA ACQUISITA**  
**MIASTENIA GRAVE CONGENITA**  
**GLICOGENOSI**

### **MIOPATIE METABOLICHE**

**IATROGENE (STEROIDI)**  
**IPO o IPERCALIEMICHE**  
**SECONDARIE a IPOTIROIDISMO**  
**SECONDARIE a IPERADRENOCORTICISMO**

### **MIOPATIE NUTRIZIONALI**

**CARENZA di Selenio e di VITAMINA E**

**MODIFICAZIONI ISTOLOGICHE ED ISTOENZIMATICHE  
EVIDENZIABILI NELLE PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI DEL  
CAVALLO (3)**

**RABDOMIOLISI:** edema interstiziale, necrosi di Zenker, masse subsarcolemmatiche (Ca, Glicogeno), fibrosi, ipertrofia (sono colpite primariamente le fibre di tipo II).

**MIOTONIA CONGENITA:** ipertrofia delle fibre di tipo I, raggruppamento fibrale, atrofia fibrale, nuclei centrali, moderata fibrosi.

**PARALISI PERIODICA IPERCALIEMICA:** vacuoli nelle fibre di tipo IIB, variabilità dei diametri fibrili, nuclei centrali, necrosi e degenerazione.

**ATROFIA NEUROGENA:** atrofia fibrale diffusa, variabilità dei diametri fibrili, raggruppamento fibrale, "target fibers".

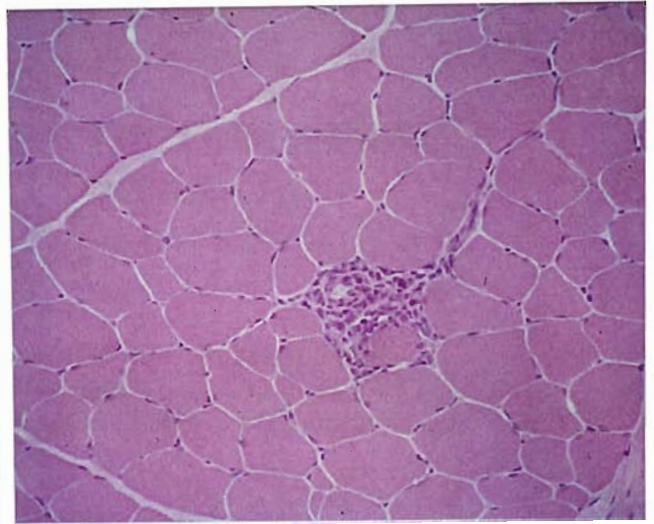
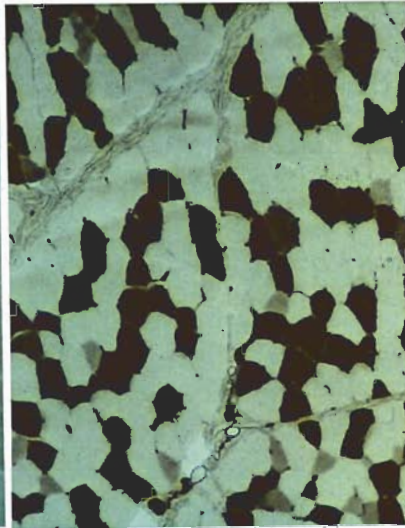
**MIOPATIA NUTRIZIONALE DA CARENZA DI SELENIO:** necrosi cerea di Zenker, degenerazione, mineralizzazione delle fibre muscolari.

**MIOSITI:** infiltrati di linfomono o polimorfonucleati, necrosi, fagocitosi, fibrosi peri ed endomisiale, fibre con "central core".

## BIBLIOGRAFIA

1. Bergstrom J: Muscle electrolytes in man. *Scand. J. Clin. Invest.*, 1962, 68, 8, Suppl.149,7.
2. Lindholm A., et al: Acute Rhabdomyolysis (Tying-up) in Standardbred Horses. *Acta Vet. Scand.* 15:325-339; 1974.
3. Frank M. Andrews, Stephen M. Reed, Gayle C. Johson: *Muscle biopsy in the horse: its indications, techniques, and complications.* *Veterinary Medicine:* 357-365; 1993.
4. Andrews F.M., Spurgeon T.L.: *Histochemical staining characteristics of normal horse skeletal muscle.* *AJVR* 47: 1843-1852; 1986.
5. Essen B. et al.: *Histochemical properties of muscle fiber types and enzyme activities in skeletal muscles of standardbred trotters of different ages.* *Eq. Vet. J.*:175-180; 1980.
6. Snow D.H., Guy P.S.: *Percutaneous needle muscle biopsy in the horse.* *Eq. Vet. J.* 8(4): 150-155; 1976.
7. McGavin M.D.: *Muscle biopsy in veterinary practice.* *Vet. Clin. North Am. (Sm. Anim. Pract.)* 13:135-144; 1983.
8. Henckel P.: *Training and growth induced changes in the middle gluteal muscle of young standardbred trotters.* *Eq. Vet. J.* 15: 134-140; 1983.
9. Frank M. Andrews, Spurgeon T. L.: *Histochemical staining characteristics of normal horse skeletal muscle.* *AJVR* 47(8): 1843-1852; 1986.
- 10.Engel W.K., Cunningham G.C.: *Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh frozen sections.* *Neurology* 1963; 13: 919.
- 11.Dubowitz V.: *Muscle biopsy a practical approach.* Bailliere Tindall, London p3; 1985
- 12.Braund K.G., Hoff E.J., Richardson K.E.Y.: *Histochemical classification of canine skeletal muscle fibers.* *AJVR* 39: 561; 1978.
- 13.Braund K.G., McGuire J.A., Lincoln C.E.: *Observation on normal skeletal muscle of mature dogs-a cytochemical, histochemical and morfometric study.* *Vet. Pathol:* 19: 577; 1982.
- 14.Orvis J.S., Cardinet G.H.: *Canine muscle fibre types and susceptibility of masticatory muscle to myositis.* *Muscle Nerve* 4: 354; 1981.
- 15.Essen B., Lindholm A., Thornton J.:*Histochemical properties of muscle fiber types and enzyme activities in skeletal muscle of standardbred trotters of different ages.* *Equine Vet. J.* 12:175; 1980.
- 16.Braund K.G., Dillon A.R., August J.R., et al.: *Hypothyroid myopathy in two dogs.* *Vet. Pathol.* 18: 589; 1981.
- 17.Braund K.G., Steiss J.E., Marshall A.E., et al.: *Morphologic and morphometric studies of the intrinsic laryngeal muscles in clinically normal adult dogs.* *AJVR* 49: 2105; 1988.
- 18.Braund K.G., McKerrell R.E., Toivio Kinnucan M., et al.: *Limb-girdle muscular dystrophy. Animal model of human disease. Hereditary myopathy in Labrador Retrievers.* *Comp. Pathol. Bull.* 21(2): 2; 1989.
- 19.Pflugfelder C.M., Cardinet G.H., Lutz H., et al.: *Acquired myasthenia gravis: immunocytochemical localization of immune complexes at neuromuscular junctions.* *Muscle Nerve* 4: 289; 1981.

20. Cardinet G.H., Shelton G.D., Willis S.E.: *Type 2 myofiber subtype specific antibodies in a dog with polymyositis and myasthenia gravis*. Anat. Histol. Embryol. 15: 168; 1986.
21. Shelton G.D., Cardinet G.H., Bandman E.: *Canine masticatory muscle disorders: a study of 29 cases*. Muscle Nerve 10: 753; 1987.
22. Cooper B.J., Winand N.J., Stendman H. et al.: *The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs*. Nature 334: 154; 1988.
23. Shelton G.D.: *Differential diagnosis of muscle diseases in companion animals*. PVN Vol.2, n. 1; 1991.
24. Braund K.G.: *Nerve and muscle biopsy techniques*. PVN Vol. 2, n. 1; 1991.
25. Braund K.G.: *Myopathies in dog and cats: reviewing the conditions of unknown and exogenous origin*. Vet. Med., 81:918-928, October 1986.
26. Scarlato G.: *Il ruolo della biopsia muscolare nella diagnosi delle malattie neuromuscolari*. Osp. Magg., vol.76, n. 5, 1981.
27. Bruce V.L., Turek R.J. and W.A. Schurg: *Muscle fibre compartmentalisation in the gluteus medius of the horse*. Equine vet. J., 25 (1), 69-72, 1993.



1  
2  
Fig. 1/2: Sezione trasversale di muscolo gluteo medio normostrutturato (zona superficiale) di cavallo. Fibre di tipo I in nero, fibre di tipo IIA in grigio pallido, fibre di tipo IIB in grigio. ATPasi miosinica  $Ca^{++}$  dipendente pH 4.37, 200X./  
Sezione trasversale di muscolo bicipite femorale normostrutturato di cane. Si osservano fibre di tipo I in nero, IIA in grigio pallido e IIC in grigio. ATPasi miosinica  $Ca^{++}$  dipendente pH 4.3, 100X.

Fig. 3: Necrosi e fagocitosi miofibrile, muscolo bicipite femorale di cane. Ematossilina - eosina, 200X.

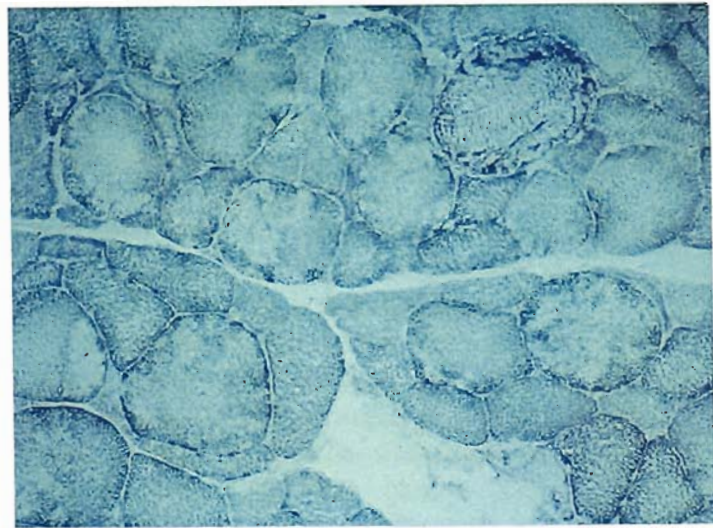


Fig. 4: Ipertrofia delle fibre di tipo I (fibre scure) ed atrofia delle fibre di tipo II nel muscolotibiale e craniale di cane con miopatia neurogena. ATPasi miosinica  $Ca^{++}$  dipendente pH 4.3, 200X.

Fig. 5: Ipertrofia ed alterata distribuzione reticolare degli enzimi ossidativi nelle fibre di tipo I nel muscolo tibiale craniale di cane, con miopatia di origine neurogena. NADH - tetrazoliodridasi, 200X.

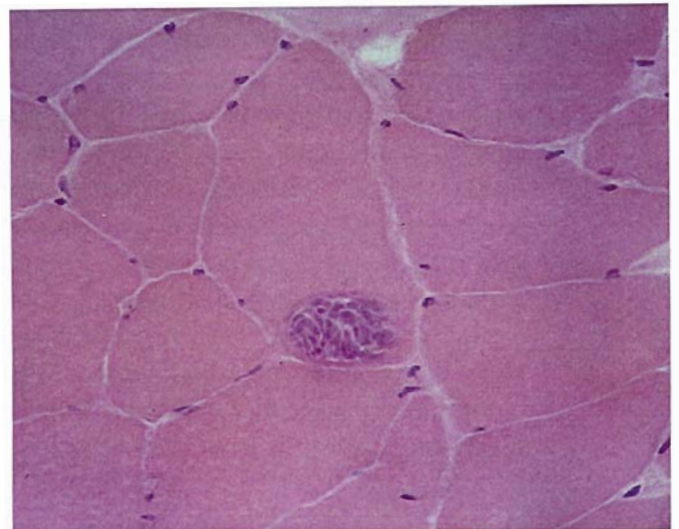
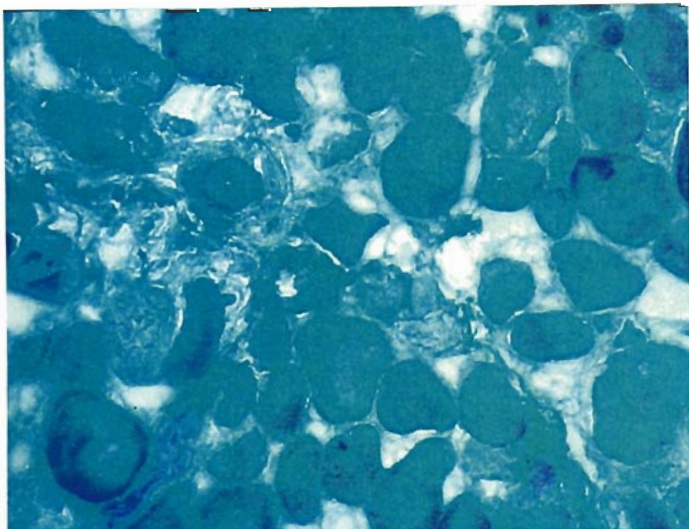


Fig. 6: Rabdomiolisi nel muscolo bicipite femorale di cavallo. Tricromica modificata di Gomori, 200X.

Fig. 7: Cisti protozoaria nel muscolo gluteo medio di cavallo. Ematossilina - eosina, 400X.

# LA DISTROFIA MUSCOLARE TIPO DUCHENNE-BECKER. ASPETTI COMPARATI.

PAPPARELLA S.

*Dipartimento di Patologia, Profilassi ed Ispezione degli Alimenti.  
Sezione Anatomia Patologica.  
Facoltà di Medicina Veterinaria. Università "Federico II". Napoli*

La distrofia muscolare tipo Duchenne/ Becker (DMD/BMD) dell'uomo è una miopatia ereditaria, X-linked, caratterizzata da un decorso progressivo. E' la più comune e la più grave, tant'è che colpisce 1/3500 maschi. Anche le carriers possono ammalarsi, ma generalmente la malattia ha un decorso più benigno.

Il gene della DMD, localizzato sul braccio corto del cromosoma X, sottoregione Xp21, fu scoperto nel 1985 da Kunkel e coll., mentre il suo prodotto genico, chiamato distrofina, fu descritto da Hoffman nel 1987. Attualmente si conoscono 3 malattie dei muscoli striati causate da mutazioni del gene della distrofina: la DMD caratterizzata da assenza pressochè completa di distrofina in tutti i muscoli striati, la BMD causata da anomalie qualitative o quantitative della distrofina ed una cardiomiopatia dilatativa X-linked, causata da anomalie qualitative della distrofina solo nel miocardio. Molto importante è stata l'identificazione di modelli animali della DMD resa possibile dalla specificità del danno biochimico della DMD nell'uomo e dall'alto grado di conservazione del gene della distrofina e della proteina nella scala evolutiva. Distrofie muscolari X-linked nei nostri animali sono state descritte nel topo (Bulfield et al., 1989), cane (Cooper et al., 1988) e gatto (Carpenter et al., 1989) (vedi tabella). Nel cane, il modello animale in cui la distrofia muscolare è pressochè sovrapponibile alla DMD sia dal punto di vista clinico che istopatologico (Valentine et al., 1988), è nota nel Golden Retriever, descritta in altre razze quali l'Irish terriers, Samoyedi e Rottweilers.

Ricordo che nel pollo, topo, hamster e cane sono descritte anche distrofie muscolari autosomiche recessive.

Nel cane, gatto, topo la lesione biochimica essenziale è il deficit di distrofina.

Questa è una proteina del citoscheletro, situata internamente al sarcolemma di 427 kd, in cui si riconoscono 4 domains strutturali: 1) un domain NH2 terminale, simile all' actinina; 2) un domain formato da una tripla elica centrale simile alla spectrina; 3) un domain omologo al COOH terminale dell' actinina e 4) un COOH terminale che non mostra invece omologie a sequenze proteiche descritte. Essa si associa a formare un omodimero antiparallelo facendo perno sulla tripla elica centrale. In questa forma dimerica, la distrofina giustapporrebbe i gruppi aminici e carbossilici terminali che o si associano tra di loro o con altri dimeri di distrofina che ancorano alla faccia interna della membrana plasmatica (Hoffman e Kunkel, 1989).

Questo modello, però, non ci dà informazioni sulla funzione svolta dalla proteina e quindi sui possibili meccanismi patogenetici che sono responsabili della progressiva necrosi delle fibre muscolari. Alcuni anni dopo la scoperta di

Hoffman, nel 1989, Campbell e Kahl hanno evidenziato che la distrofina si aggancia con il domain NH<sub>2</sub> terminale alla F-actina, mentre il suo COOH terminale si connette alla laminina, una componente della matrice extracellulare, grazie ad un complesso di glicoproteine e proteine di membrana (Dystrophin Associated Glycoprotein) (Fig.1).

Due sono le molecole chiave in questo processo di aggancio: la 43DAG e la 156 DAG, che per la loro natura glicosilata e la loro connessione con la distrofina, sono state denominate rispettivamente  $\beta$  ed  $\alpha$  distroglicano. Questo complesso di glicoproteine ha una posizione trans-sarcolemmica ed aggancia le proteine del citoscheletro alla matrice extracellulare. In tal modo, esso svolge un duplice ruolo: sia strutturale, stabilizzando la membrana citoplasmatica durante la contrazione, sia funzionale, regolando la concentrazione del calcio intracellulare.

Questo modello strutturale può contribuire a chiarire gli eventi che, con meccanismo specifico, determinano la necrosi progressiva delle fibre muscolari nella DMD.

Si è visto che nei soggetti DMD, BMD e nelle carriers sintomatiche, l'assenza di distrofina causa una drastica riduzione delle glicoproteine di membrana. Tale perdita è la diretta conseguenza dell'assenza della distrofina e non è secondaria alla degenerazione delle fibre. Infatti: 1) tutte le DAG sono conservate in altre malattie neuromuscolari caratterizzate da necrosi delle fibre muscolari 2) la perdita delle DAG è comune a tutti i pazienti DMD di qualsiasi età; 3) la perdita delle DAG si osserva in tutte le fibre, indipendentemente dalla gravità della lesione; 4) altre proteine del citoscheletro come la spectrina sono normalmente presenti. L'assenza della distrofina fa sì che non ci sia più alcuna connessione tra le proteine sub-sarcolemmiche del citoscheletro e la matrice extracellulare. La conseguente instabilità del sarcolemma può consentire delle vere e proprie soluzioni di continuo durante la fase di contrazione.

Recentemente sono state descritte due malattie muscolari autosomiche recessive caratterizzate da anomalie delle DAG (50 e 43 DAG), ma da una normale espressione della distrofina. Questi pazienti avevano una sintomatologia molto simile ai soggetti con grave DMD. L'importanza che assume la caratterizzazione di queste distrofie è facilmente intuibile perchè si tratta di forme autosomiche recessive e quindi non X-linked, perciò è necessario l'esame immunocitochimico anche delle DAG, soprattutto se ci si trova di fronte a casi sporadici di distrofia con storia familiare negativa e/o a pazienti che hanno una quantità ridotta di distrofina ma di peso molecolare normale. Nel 1995 la Cardiomiologia e Genetica Medica della II Università di Napoli, in collaborazione con la nostra Sezione, ha segnalato il caso di una famiglia in cui un'alterata espressione del complesso glicoproteico simulava un quadro immunostologico distrofinopatico e una ereditarietà X-linked. Sembrerebbe quindi che un'anomala espressione delle DAG può di per se influenzare l'espressione della distrofina; attualmente quindi vengono considerate DMD/BMD carriers solo quei soggetti nei quali è possibile evidenziare una mutazione nel gene della distrofina (Politano et al., 1995).

L'assenza o relativa mancanza di distrofina è causata da mutazioni del gene, gene che è 10 volte più grande di ogni altro gene sino ad ora caratterizzato ed il suo RNAm viene codificato da 80 esoni. Forse l'alta percentuale di soggetti

affetti da tale distrofia è dovuta proprio alle grosse dimensioni del gene, per la maggiore possibilità che si verifichino mutazioni.

La maggior parte delle mutazioni che inattivano il gene sono delezioni. Sono state identificate duplicazioni (10%) e mutazioni puntiformi (10-15%), ma comunque c'è un 10% circa dei pazienti DMD nei quali non è stata evidenziata alcuna mutazione. Per circa trent'anni la DMD e la BMD erano ritenute malattie diverse; ora, grazie alla possibilità di analisi del DNA si sa che i soggetti Becker sono capaci di produrre un RNAm, che sebbene deletato per una parte della sua sequenza, può presiedere alla produzione di una proteina semifunzionale (in frame mutation), mentre nei soggetti Duchenne si congiungono esoni che non possono dirigere la traslazione dell'RNAm (out of frame mutation). Perciò i soggetti DMD non producono alcuna proteina, mentre i BMD possono produrre una proteina di p.m. ridotto (Hoffman e Kunkel, 1989).

Delezioni nel gene della distrofina sono state osservate nel topo (Ryder-Cook et al., 1988), ma non nel gatto (Carpenter et al., 1989). Nel cane, piuttosto recentemente è stata evidenziata a livello muscolare una mutazione-transizione, con alterazione del codice di lettura della proteina (splice-site mutation) (Sharp et al., 1992).

Clinicamente, nell'uomo (Hoffman e Kunkel, 1989) la DMD si evidenzia tra i 2-5 anni e la progressiva debolezza muscolare che si instaura costringe i pazienti ad utilizzare la sedia a rotelle (intorno ai 10 anni). Raramente questi sopravvivono oltre i 20 anni e soccombono generalmente e/o per insufficienza respiratoria o cardiaca. Nei BMD si ha un decorso clinico più lento, il malato è in grado di camminare anche oltre i 20 anni ed in genere ha una vita pressochè normale a meno che non si instauri una possibile e grave cardiomiopatia.

Sia nella DMD che nella BMD si osserva un marcato aumento della creatin chinasi che persiste per quasi tutto il decorso della malattia e che si normalizza negli stadi terminali. I valori della CK erano ritenuti importanti per individuare le carriers, oggi si sa che il 50% circa delle carriers certe non ha la CK alterata.

Nel cane (Valentine et al., 1992) e nel gatto (Carpenter et al., 1988) generalmente la malattia si evidenzia verso i 3 mesi e gli animali muoiono verso i 2 anni. In entrambe le specie c'è un marcato aumento della CK. Nel gatto e topo è assente la debolezza muscolare tipica dell'uomo e del cane. Ciò si spiega soprattutto nel topo con la grossa potenzialità rigenerativa mostrata dalle fibre muscolari durante tutto la durata della malattia. Nell'uomo e nel cane i fenomeni rigenerativi che vengono interpretati come fenomeno compensatorio sono scarsamente presenti. Nell'uomo e nel cane, solo negli stadi iniziali della malattia, si evidenzia una marcata ipertrofia di alcuni gruppi muscolari (gastrocnemi e quadricipite nell'uomo; lingua, diaframma, deltoide, sartorio, tibiale craniale nei cani) comunque associata ad atrofia di altri muscoli, mentre, col tempo, prevale l'atrofia generalizzata. L'ipertrofia negli stadi iniziali della malattia deve considerarsi una pseudoipertrofia.

Nel topo e nel gatto, anche se in maniera meno marcata nel topo, è più accentuata l'ipertrofia vera delle masse muscolari, dovuta alla marcata ipertrofia delle fibre muscolari.

All'esame istologico (Engel,1986), la DMD e la BMD, mostrano lesioni analoghe solo che nella BMD queste tendono ad essere meno marcate. La lesione più caratteristica della distrofia muscolare in tutte le specie animali e nell'uomo è la necrosi delle fibre muscolari (Fig.2-3), evidente sin dalla nascita nel cane e nell'uomo, mentre nel topo comincia approssimativamente a 2-3 settimane di età. E' una lesione presente durante tutto il decorso della malattia e spiega gli elevati livelli di CK presenti in questi soggetti. Frequente, specie negli stadi iniziali, è la presenza di fibre ialine che sono fortemente eosinofile alla colorazione con il metodo ematossilina-eosina, intensamente tinte in verde con il metodo di Gomori.

Altra lesione comune è il polimetrisimo fibrile (Fig.4). La forte disparità dei diametri fibrili è dovuto anche alla presenza di piccole fibre rigenerate e grosse fibre ipertrofiche.

Spesso si osserva "splitting" delle fibre associato a centralizzazione dei nuclei e calcificazioni. La metodica dell'ATP-asi mostra generalmente una predominanza delle fibre tipo 1; comunque a ph 9,4 si può avere una scarsa differenziazione fra i vari tipi di fibre. A ph 4,3 si possono osservare fibre tipo 2C, espressione dei fenomeni rigenerativi del muscolo. La necrosi delle fibre, lo splitting, la grossa variabilità dei diametri delle fibre sono lesioni comuni agli animali e all'uomo e perciò sono considerate manifestazioni primarie.

Altre lesioni come la fibrosi e l'infiltrazione di grasso e l'atrofia si evidenziano nei soggetti più adulti, e sono pronunciate solo nell'uomo e nel cane. La fibrosi è correlata alla estensione della perdita del muscolo e questa con la debolezza dei soggetti ammalati.

Le stesse lesioni, ma meno gravi, si osservano anche nel miocardio (Fig.5) e sono responsabili di gravi cardiomiopatie spesso fatali per i soggetti affetti da distrofia. Le lesioni cardiache sono assenti o minime nel topo MDX.

Le carriers possono essere sintomatiche e non (Bonilla et al.,1988); nelle prime generalmente le lesioni muscolari sono identiche a quelle dei maschi ma meno marcate e si manifestano più tardivamente. In una percentuale abbastanza elevata di carriers si osservano solo cardiomiopatie senza interessamento dei muscoli scheletrici.

Il fatto che le carriers possano essere sintomatiche e non è in accordo con l'ipotesi di Lyon (1961) secondo la quale l'inattivazione del cromosoma X è del tutto casuale.

Perciò la sintomatologia delle carriers dipende dalla percentuale di X normale inattivata.

In questi ultimi anni l'utilizzazione di anticorpi monoclonali diretti verso tre diversi domains della distrofina, combinata all'uso di anticorpi diretti verso la  $\beta$  spectrina, indicatore essenziale dell'integrità di membrana, è stata molto importante per chiarire la vasta gamma di fenotipi clinici osservabili in questa malattia e nell'identificazione di soggetti carriers al fine di una prevenzione della malattia (Nicholson et al.,1990). Nei soggetti affetti da DMD generalmente la distrofina è assente (Fig.7), solo occasionalmente si rinvencono fibre singole o a gruppi positive per la distrofina (Fig.8).

Nei pazienti a fenotipo lieve di DMD o grave di BMD si osserva un segnale di bassa intensità in molte fibre.

Nei soggetti BMD si può riscontrare: assenza del segnale in molte fibre, variazioni di intensità lungo le fibre o tra le fibre o un segnale molto debole se comparato a quello di un soggetto normale, sia nel muscolo scheletrico che nel miocardio (Figg.9-10-11).

Nelle femmine eterozigoti è quanto mai caratteristico l'aspetto a "mosaico" caratterizzato da una contemporanea presenza di fibre muscolari negative e positive in proporzioni variabili (Bonilla et al.,1988) (Fig.12).

Queste stesse lesioni si osservano anche nel miocardio (Nigro et al.,1994) (Fig.13).

Da quanto detto appare evidente che molti aspetti delle distrofie muscolari richiedono approfondimenti soprattutto per quanto riguarda i meccanismi patogenetici delle lesioni muscolari. E ciò in rapporto alla esigenza di un più valido approccio terapeutico rispetto alle limitate possibilità attuali.

In tale contesto gli studi sugli animali, che rappresentano ottimi modelli, debbono essere incrementati al fine di poter raggiungere il traguardo che oggi appare più possibile e cioè quello di una terapia genica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bulfield G., Siller WG., Wight PAL., Moore KJ.: X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 1189-1192.
2. Campbell KP. e Kahl SD.: Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989, 338, 259-262.
3. Carpenter JL., Hoffman EP., Romanul F., Kunkel LM., Rosales R., Ma N., Dasbach J., Rae J., Moore F., Macfee M., Pearce L.: Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Path.* 1989, 135, 909-919.
4. Cooper B., Winand N., Stedman H., Valentine BA., Hoffman Ep., Kunkel LM., Scott M., Fischbeck K., Kornegay J., Avery R., Williams JR., Schmickel JE.: The omologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 1988, 334, 154-156.
5. Engel AG., Banker BQ.: *Myology: basic and clinical.* 1986, McGraw-Hill, New York.
6. Hoffman EP., Brown RH., Kunkel LM.: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987,51, 919-928.
7. Hoffman EP., Kunkel LM.: Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker MD. *Neuron* 1989, 2, 1019-1029.
8. Kunkel LM., Monaco AP., Middlesworth W., Ochs HD., Lah S.. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 4778-4782.
9. Lyon MF.. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus. musculus* L.). *Nature* 1961, 190, 372-374.
10. Nicholson L., Johnson MA., Gardner-Medwin D., Bhattacharya S., Harris JB.: Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta neuropathologica* 1990, 80, 239-250.
11. Nigro G., Di Somma S., Comi L., Politano L., Papparella S., Restucci B., Petretta V., Giugliano M., Carotenuto A., Limongelli F.: Structural basis of cardiomyopathy in Duchenne/Becker carriers. Endomyocardial biopsy evaluation. *Ann. New York Academy of Sciences* 1994, 22, 59-61.

12. Politano L., Tedeschi S., Nigro V., Papparella S., Restucci B., Esposito M.G., Passamano L., Giugliano M.A.M., Comi L., Nigro G.: Dystrophin associated glycoprotein myopathy mimicking X-linked inheritance. *Acta Cardiologica* 1995, 7, 35-42.
13. Ryder-Cook AS., Sicinski P., Thomas K., Kavies DE., Worton R., Barnard E., Darlison MG., Barnard PN.: Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. *EMBO J.* 1988, 3017-3021.
14. Sharp NJ., Kornegay JN., Van Camp SD., Herbstreith M., Secore S., Kettle S., Hung WY., Constantinou CD., Dykstra MJ., Roses D., Bartlett RJ.: An error in dystrophin mRNA processing in Golden Retriever Muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 1992, 13, 115-121.
15. Valentine BA., Cooper BJ., de Lahunta A., O'Quinn R., Blue JT.: Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J. Neurol. Sci.* 1988, 88, 69-81.
16. Valentine BA., Winand NJ., Pradhan D., Moise NS., de Lahunta A., Kornegay JN., Cooper BJ.: Canine X-linked Muscular dystrophy as an animal model of Duchenne Muscular Dystrophy- a review. *Am. J. of Med. Genetics* 1992, 42, 352-356.

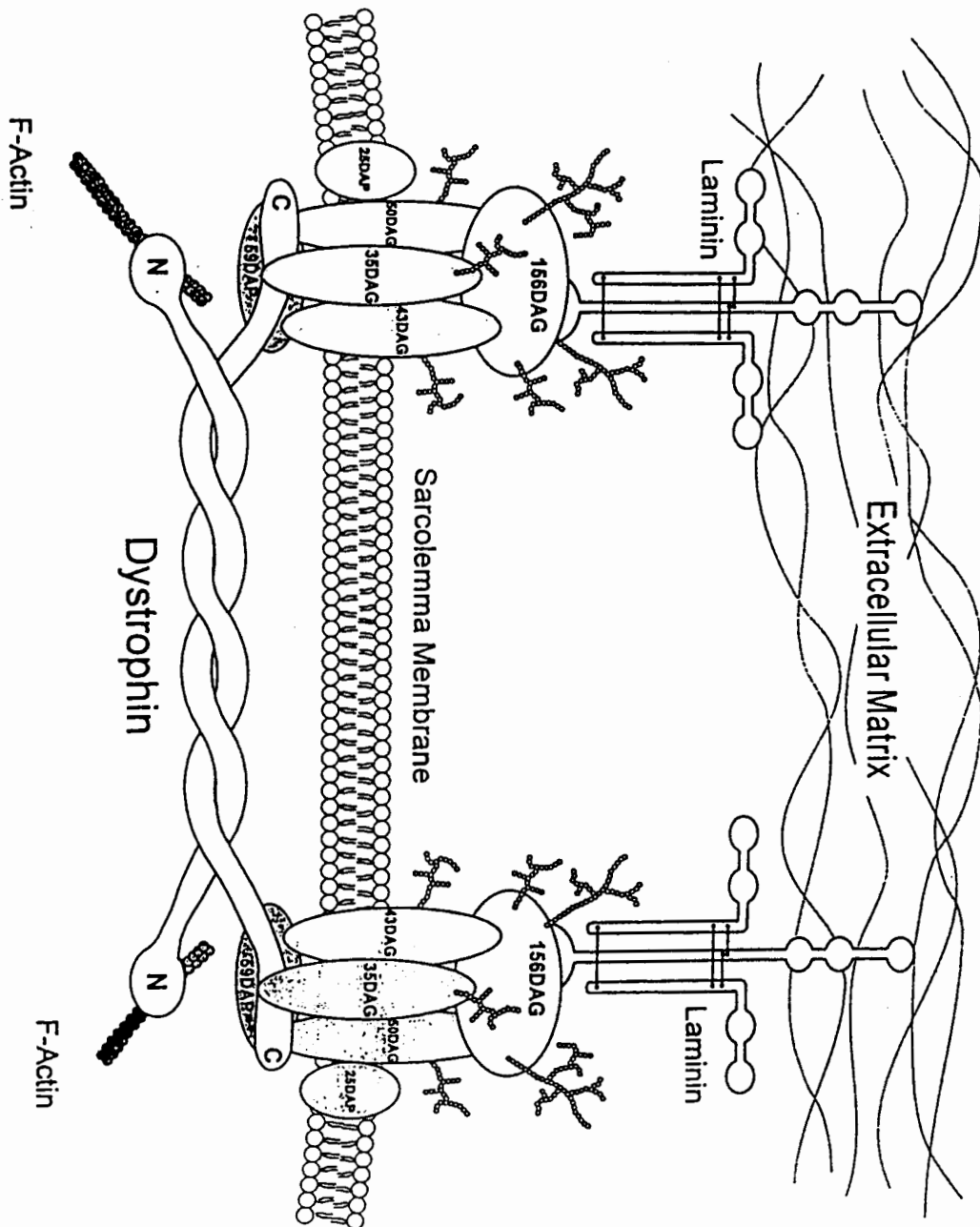


Fig.1: Modello strutturale della distrofina e del complesso di glicoproteine associate alla distrofina (DAG) proposto da Campbell e Kahl.

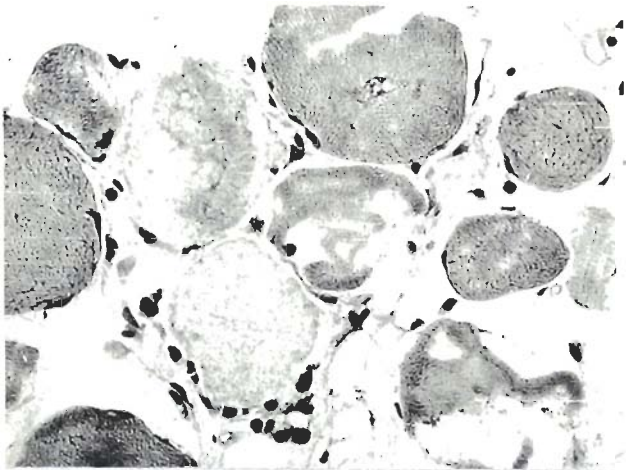


Fig. 2: Muscolo scheletrico. Aspetti della necrosi, con disfacimento fibrale. EE forte ingrandimento.

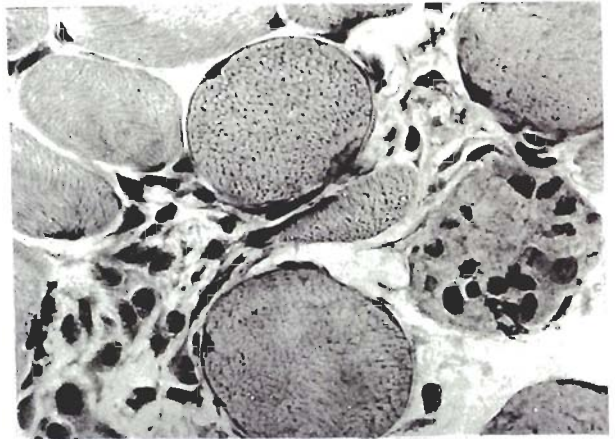


Fig. 3: Muscolo scheletrico. Fenomeni di sarcoclastosi ed attivazione degli elementi interstiziali. EE forte ingrandimento.

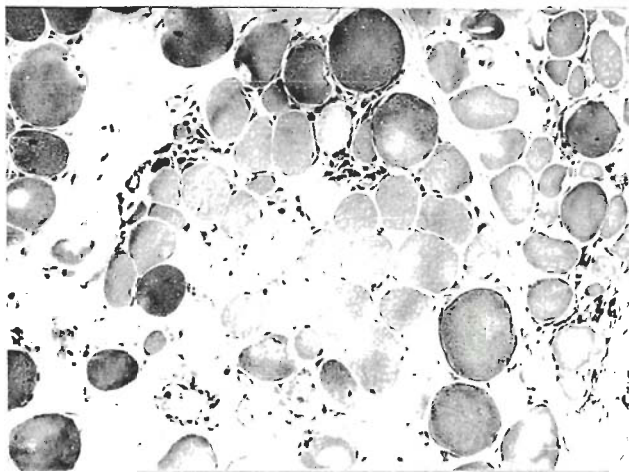


Fig. 4: Muscolo scheletrico. Disparità dei diametri fibrali con aspetti di omogeneizzazione ialina di alcune fibre. EE medio ingrandimento.

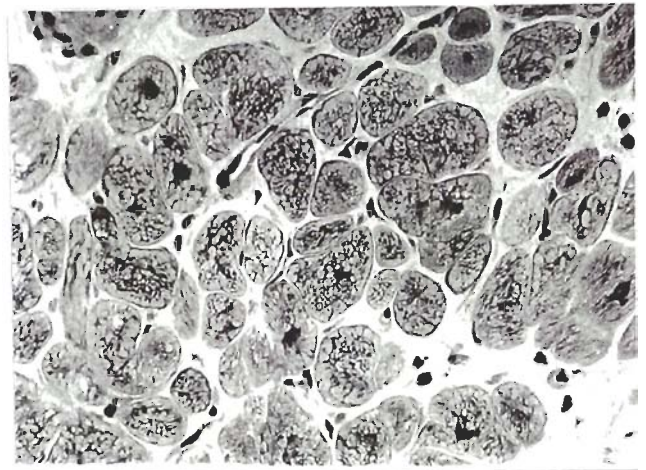


Fig. 5: Miocardio. Evidente polimetrisimo dei cardiomiociti. EE forte ingrandimento.

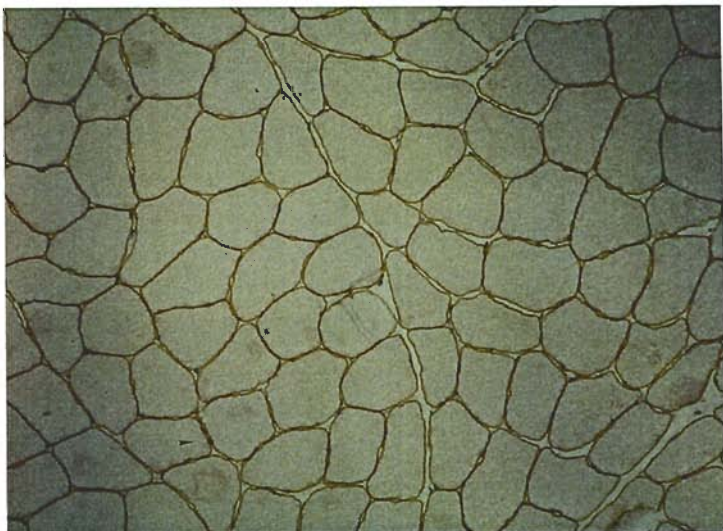


Fig. 6: Muscolo scheletrico normale. La distrofina risulta uniformemente localizzata lungo il sarcolemma di tutte le fibre. Immunoperoxidasi piccolo ingrandimento.

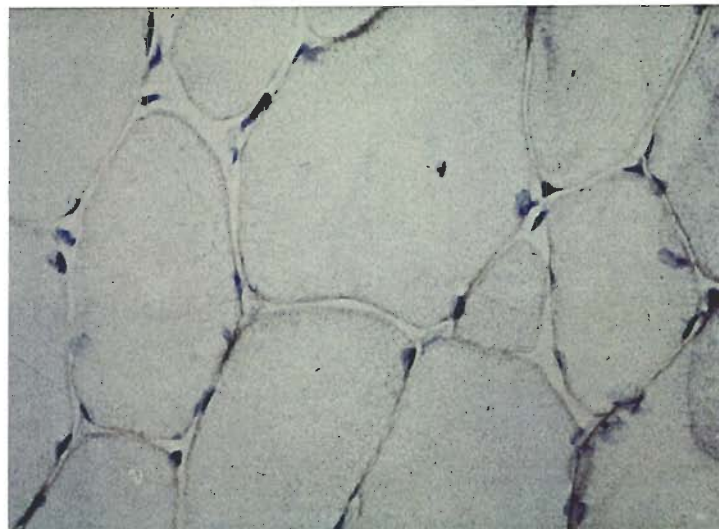
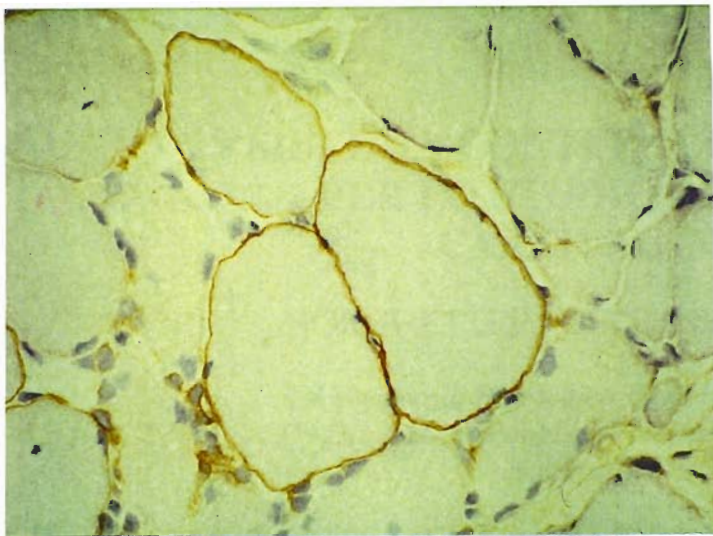
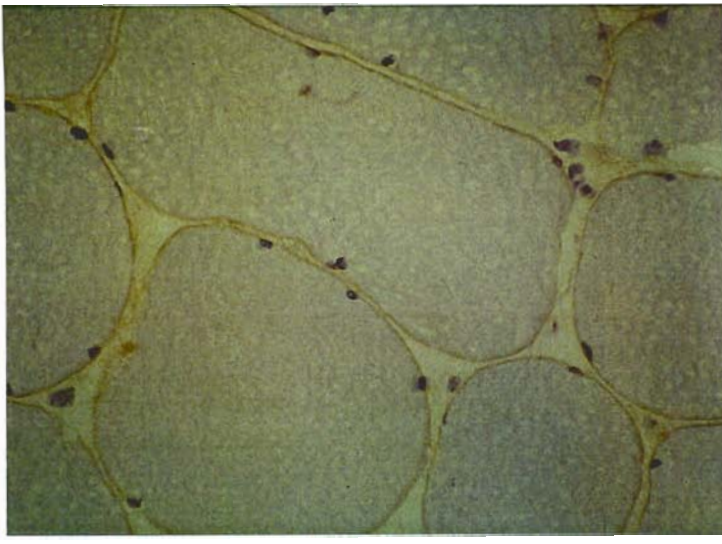


Fig. 7: Muscolo scheletrico di paziente DMD. Totale assenza della distrofina. Immunoperoxidasi medio ingrandimento.



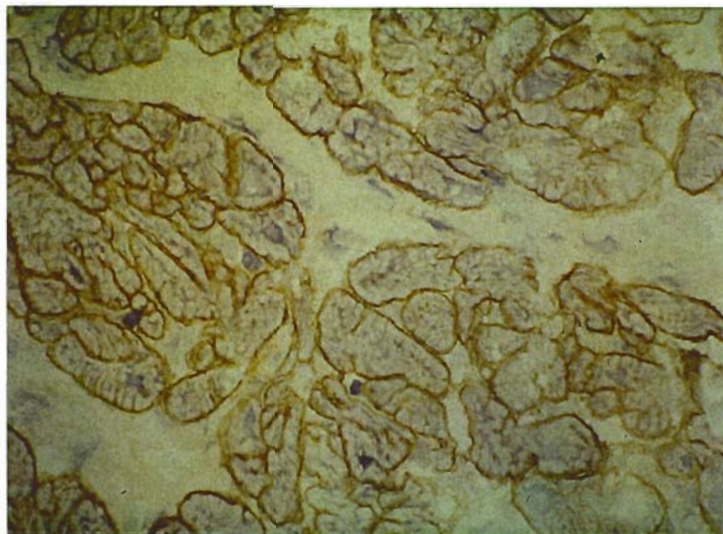
**Fig. 8:** Muscolo scheletrico di paziente DMD. Positività per la distrofina presente solo in alcune fibre. Immunoperoxidasi medio ingrandimento.



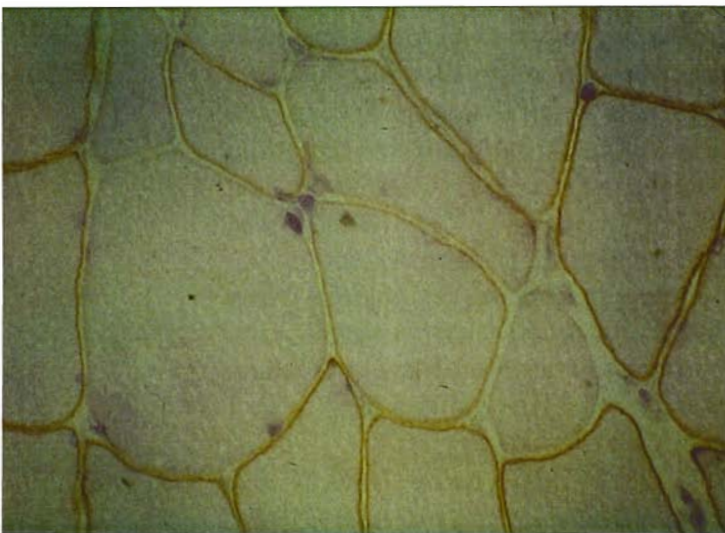
**Fig. 9:** Muscolo scheletrico di paziente BMD. La distrofina si evidenzia lungo la membrana plasmatica, ma il segnale è molto debole. Immunoperoxidasi forte ingrandimento.



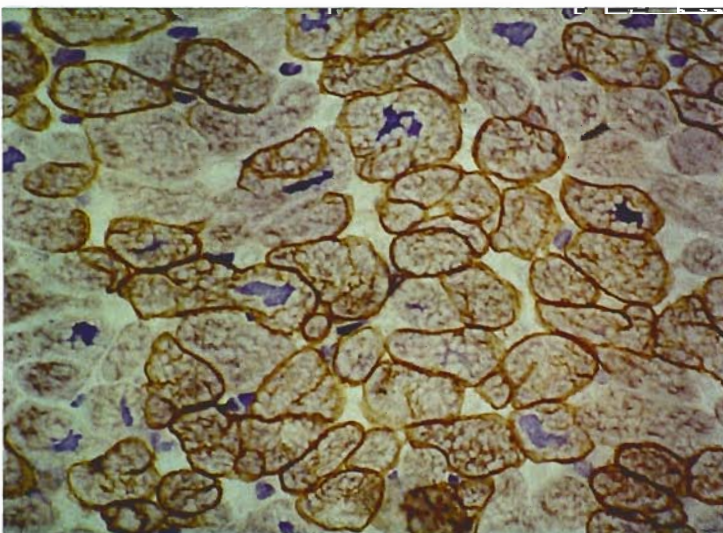
**Fig. 10:** Muscolo scheletrico di paziente BMD. Evidenti variazioni di intensità del segnale ed ampie interruzioni lungo il sarcolemma. Immunoperoxidasi forte ingrandimento.



**Fig. 11:** Muscolo cardiaco di paziente BMD. Discreta intensità del segnale che però presenta ripetute interruzioni lungo il sarcolemma. Immunoperoxidasi medio ingrandimento.



**Fig. 12:** Muscolo scheletrico di carrier sintomatica. Alternanza di fibre negative e positive per la distrofina. Immunoperoxidasi medio ingrandimento.



**Fig. 13:** Muscolo cardiaco di carrier sintomatica. Aspetto a "mosaico" caratterizzato da cardiomiociti positivi e negativi per la distrofina. Immunoperoxidasi forte ingrandimento.

# SISTEMA COLTURALE TRIDIMENSIONALE PER LO STUDIO DELLA PATOLOGIA CARTILAGINEA *IN VITRO*

BORGHETTI P., DELLA SALDA L. (\*), DE ANGELIS E.

*Ist. Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria-PARMA;  
(\*). Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Paologia. Animale - Facoltà di  
Medicina Veterinaria- BOLOGNA.*

**RIASSUNTO.** Gli Autori hanno studiato un sistema colturale in cui i condrociti isolati dalla cartilagine articolare di suino sono coltivati all'interno di un gel di alginato di sodio. Indagini microscopiche e ultrastrutturali confermano che i condrociti in tale sistema mantengono caratteristiche morfologiche (aspetto rotondeggiante, aggregazione in pseudo-lacune a coppie o come condroni) e funzionali (produzione di proteoglicani in ambito pericellulare, territoriale ed interterritoriale) tipiche dell'organizzazione cellulare e strutturale del tessuto cartilagineo *in vivo*. Inoltre si è analizzato il trasporto di un osmolita compatibile, la betaina, fenomeno precedentemente studiato in condrociti coltivati in adesione come risposta adattativa specifica del condrocita al trattamento iperosmolare; mentre nelle colture in adesione tale risposta si manifesta entro la prima settimana di coltura ma tende a ridursi nel tempo, nei condrociti coltivati in alginato essa si mantiene inalterata anche prolungando i tempi colturali.

**Parole chiave:** Condrociti - Coltura tridimensionale - Alginato - Iperosmolarità - Suino.

## INTRODUZIONE

Diversi tipi di sistemi colturali sono stati utilizzati per lo studio della fisiopatologia del condrocita. La conoscenza di diversi aspetti della fisiologia del condrocita è stata possibile grazie all'uso di sistemi colturali in cui le cellule cartilaginee isolate dal tessuto sono coltivate ad alta densità ed in adesione su plastica (Kuettner et al, 1982; Solurshet al., 1982; Thonar et al., 1983). Il maggiore svantaggio di questo tipo di modello è rappresentato dal fatto che le cellule cresciute in adesione si mantengono fenotipicamente stabili (secrezione di proteoglicani e di molecole collagene tipiche della cartilagine) solo per poche settimane di coltura (Thonar et al., 1986). Successivamente i condrociti coltivati in monostrato possono rapidamente perdere il loro differenziamento assumendo una morfologia fibroblastoide e secernendo collagene tipo I, III e V (von der Mark, 1986).

Attualmente si stanno studiando metodi di coltura in cui i condrociti sono coltivati in un ambiente semi-solido (agarosio, alginato) che ricrea un microambiente spaziale simile al tessuto. In tali condizioni il fenotipo è mantenuto stabilmente e viene prodotta matrice con caratteristiche strutturali tipiche della cartilagine (Hauselmann et al., 1994).

In nostri precedenti studi l'applicazione del modello in monostrato, caratterizzato morfologicamente e funzionalmente, ci ha permesso di analizzare il comportamento del condrocita sottoposto a stress osmotico, condizione che si realizza normalmente e patologicamente *in vivo* sotto l'azione di forze meccaniche (Borghetti et al., 1995).

Condrociti coltivati ad alta densità hanno mostrato una rapida ed efficace risposta adattativa al trattamento iperosmolare (500 mOsm), in presenza nel medium di un osmolita compatibile, la betaina, che sembra essere assunto dalla cellula grazie all'attivazione di sistemi di trasporto specifici (dati in corso di pubblicazione). Al tempo stesso si è sospettato che tale risposta adattativa specifica all'iperosmolarità possa essere condizionata dal sistema colturale stesso o dai tempi di coltura potenzialmente in grado di influenzare la morfologia e/o il differenziamento del condrocita.

Nel presente lavoro si è studiato un sistema colturale tridimensionale (condrociti all'interno di alginato) allo scopo non solo di assicurare una stabilità fenotipica alle cellule, ma anche per valutare se tale coltura consenta il mantenimento della risposta adattativa allo stress osmotico a tempi lunghi di coltura.

## **MATERIALI E METODI**

### ***COLTURE CELLULARI***

I condrociti sono isolati da frammenti di cartilagine prelevata, in condizioni sterili, dall'articolazione omero-radio-ulnare di suini di 10 mesi di età. I pezzi di cartilagine ottenuti sono sminuzzati finemente e lavati numerose volte in tampone fosfato salino (PBS). Dopo una preincubazione in pronase 0.2% per 1 ora, il tessuto è trattato con 0.25% collagenasi tipo IA per 2ore; tutte le fasi della digestione sono fatte in Dulbecco's Modified Eagle's medium (D-MEM) contenente penicillina (100U/ml) e streptomina (100µg/ml).

Il tessuto digerito è filtrato attraverso due successivi filtri di nylon di cui il primo con pori di 100µm ed il secondo di 20µm; la sospensione cellulare così ottenuta è quindi centrifugata, il supernatante eliminato ed il pellet di cellule lavato numerose volte con D-MEM supplementato col 10% di siero di vitello fetale (FCS).

I condrociti isolati sono risospesi in alginato di sodio (1.2% in NaCl 0.9%) alla densità di  $4 \times 10^6$  cellule/ml di alginato, la sospensione così ottenuta è fatta cadere goccia a goccia con l'aiuto di una siringa con ago di 22G in una soluzione di CaCl<sub>2</sub> 102mM; le sfere che si formano sono lasciate alcuni minuti in tale soluzione e successivamente lavate tre volte con NaCl 0.9% e una volta con D-MEM, dove vengono lasciate per 10'; a questo punto le sfere sono trasferite in piastre con D-MEM al 10% di FCS.

Dopo 6 e 15 giorni di coltura, sulle cellule coltivate in alginato sono effettuate indagini morfologiche ottiche e ultrastrutturali ed è analizzato il trasporto di betaina indotto da trattamento iperosmolare (500 mOsm); i successivi risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da colture di condrociti seminati su plastica ad alta densità e sottoposti ad analoghe indagini agli stessi tempi sperimentali.

## *TRATTAMENTO IPEROSMOLARE e MISURA DEL TRASPORTO DI BETAINA.*

A 6 e 15 giorni di coltura, è stato misurato il trasporto di betaina in cellule sottoposte a trattamento iperosmolare (500 mOsm) per 24 ore in confronto a cellule mantenute in medium isosmolare (D-MEM 300 mOsm). L'aumento di osmolarità del medium è ottenuta con l'aggiunta di NaCl al D-MEM e misurata con osmometro (Wescor).

Dopo il trattamento, si è aspirato il medium e le sfere sono lavate una volta con 2ml di EBSSG a 37°C. Le cellule sono state quindi incubate per 20 minuti a 37°C nella medesima soluzione salina per permettere la completa deplezione del pool aminoacidico intracellulare.

Al termine dei 20 minuti, le sfere di alginato sono lisate con soluzione tampone contenente 50 mM di Citrato di Na e 50 mM di EDTA e le cellule liberate dall'alginato sono incubate per 10 minuti in EBSSG a 37°C contenente 0.1mM di betaina e 1 $\mu$ Ci/ml di <sup>3</sup>H-Betaina.

Il trasporto è stato quindi bloccato con aggiunta di 2ml di EBSSG a 4°C a cui sono seguiti tre lavaggi sempre con la medesima soluzione salina a 4°C. Dopo aggiunta di TCA al 10% a 4°C per 10 minuti, si è raccolta la frazione acidosolubile e dopo aggiunta di liquido di scintillazione, la misura della radioattività è effettuata in uno scintillatore in fase liquida.

Le cellule sono poi solubilizzate con NaOH 0.2N per la determinazione del contenuto proteico tramite saggio Bio Rad di colorazione al Comassie blu R 250.

## *INDAGINI MORFOLOGICHE*

Per l'analisi morfologica le colture sono lavate due volte con tampone cacodilato 0.1M pH 7.2, trattate con soluzione di CaCl<sub>2</sub> 55 mM per indurire l'alginato, e quindi fissate in 0.1M tampone cacodilato contenente 0,5% glutaraldeide-0.7% rutenio esamina tricloruro (RHT)-lisina 100mM per 30 minuti a 4 °C. Al termine della fissazione, le colture in alginato sono lavate alcune volte in tampone cacodilato e post-fissate con tetrossido di osmio diluito nel medesimo tampone a temperatura ambiente per circa 45 minuti, disidratate in serie di alcool crescenti ed incluse in resina Durcupan ACM. Sono approntate sezioni semifini colorate con il blu di toluidina e sezioni ultrafini, contrastate in acetato di uranile e tetrossido di piombo. L'osservazione di quest'ultime è stata effettuata con un microscopio elettronico a trasmissione Zeiss OM 109.

## **RISULTATI**

### *INDAGINI AL MICROSCOPIO OTTICO*

Al microscopio ottico i condrociti appaiono uniformemente inglobati all'interno delle sfere di alginato ad una concentrazione approssimativamente stimata intorno alle 6-7 x 10<sup>4</sup> cellule (Fig. 1)

L'analisi delle sezioni semifini approntate per la microscopia elettronica evidenzia aspetti particolari del comportamento dei condrociti coltivati all'interno dell'alginato. I condrociti si presentano all'interno di pseudo-lacune, talora singolarmente, ma più frequentemente appaiati o in gruppi di tre o più cellule (Fig. 2).

Intorno alla lacuna che racchiude le cellule e tra le cellule stesse si evidenzia un alone metacromatico al blu di toluidina; la specificità della reazione istochimica e la fissazione applicata, che implica l'uso di rutenio esamina tricloruro allo scopo di preservare molecole polianioniche, testimonia della produzione di matrice da parte dei condrociti in ambito pericellulare e territoriale. Infatti questo alone presenta una zona più vicina alla cellula meno intensamente colorata e un bordo immediatamente più esterno decisamente metacromatico (freccia in Fig.2).

### *INDAGINI ULTRASTRUTTURALI*

Le cellule poste in alginato da una settimana (Fig. 3) hanno una morfologia rotondeggiante od ovalare, la membrana citoplasmatica presenta alcune stroflessioni di lunghezza variabile, mentre nel citoplasma si rintracciano numerose gocce lipidiche di notevole dimensione, ed abbondante glicogeno. Ben evidenti appaiono l'apparato del Golgi, con numerose cisterne e vescicole, ed il reticolo endoplasmatico rugoso, le cui cisterne sono spesso dilatate per la presenza di materiale granuloso denso, di probabile natura proteica, al loro interno. I mitocondri appaiono ben strutturati. La cromatina nucleare si presenta normalmente addensata in piccoli aggregati, per lo più disposti attorno alla membrana nucleare.

Si nota la presenza di molecole proteoglicaniche nelle immediate vicinanze della membrana cellulare (Fig 4) e che tendono ad aumentare formando discreti aggregati procedendo verso il limite definito dal gel di alginato e tra le cellule appaiate (freccia in Fig. 3).

Si è notata la presenza, nelle zone in vicinanza di estroflessioni della membrana cellulare, di sottili fibrille disposte in piccoli fascetti e di orientamento casuale (Fig. 5). Di frequente riscontro è la presenza di condrociti disposti in gruppi di tre, quattro cellule (Fig. 6).

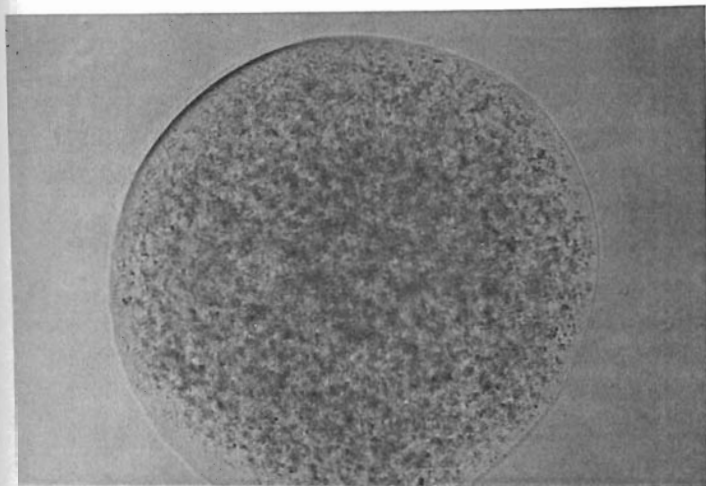


Fig. 1: Condrociti articolari di suino coltivati all'interno di sfere di alginato di sodio alla densità di  $6-7 \times 10^4$  cellule per sfera.

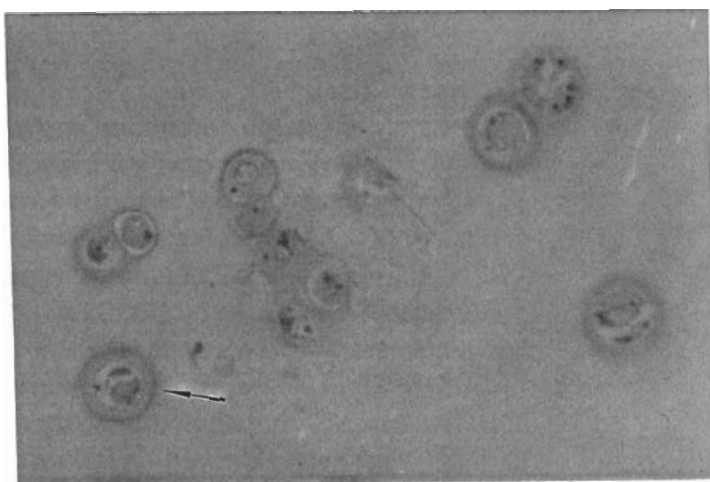


Fig. 2: Condrociti articolari di suino coltivati all'interno di sfere di alginato di sodio successivamente fissate ed incluse in resina epossidica. Sezioni semifini colorate con blu di toluidina. 600x.



Fig. 3: Condrociti articolari all'interno di pseudo-lacune di alginato di sodio. Vedi testo. TEM 8.000x.

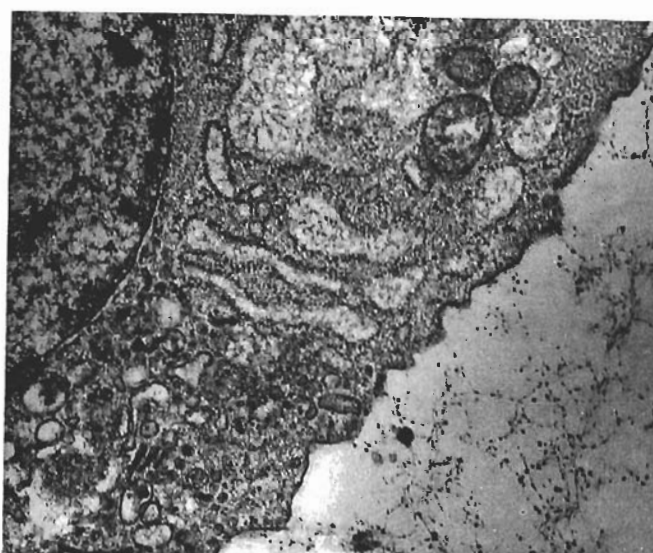


Fig. 4: Condrociti all'interno di sfere di alginato. Aggregati di proteoglicani in ambito pericellulare(vedi testo). TEM 54.000x.

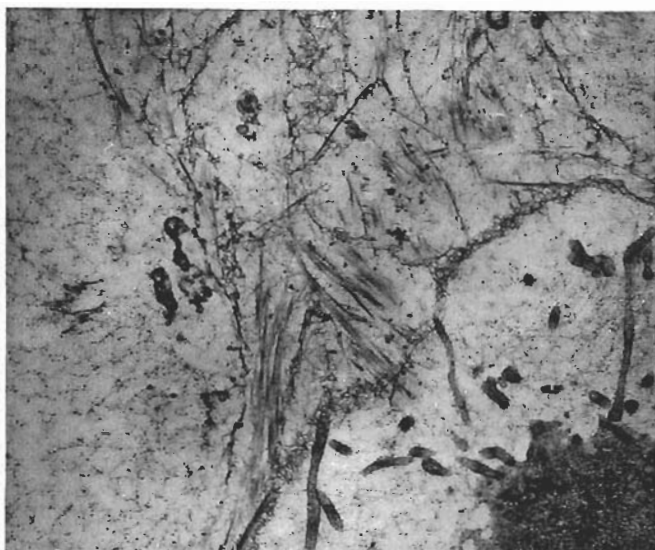


Fig. 5: Condrociti all'interno di sfere di alginato. Presenza di esili fibrille in vicinanza di estroflessioni cellulari. TEM 22.000x

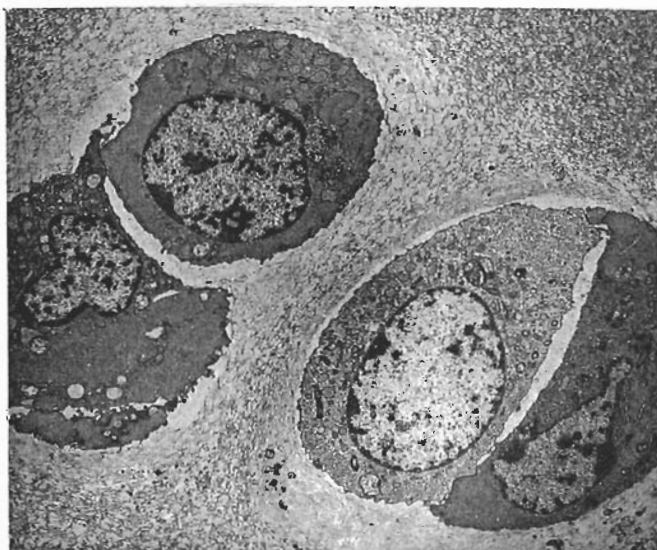


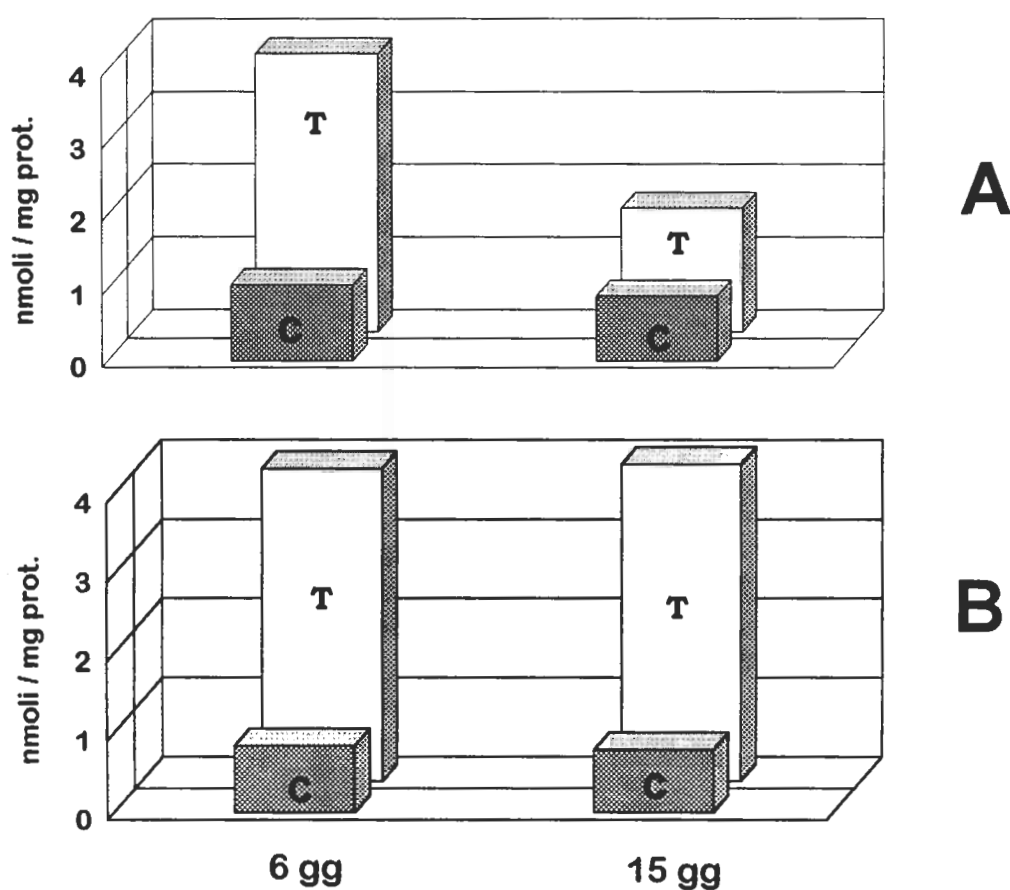
Fig. 6: Condrociti all'interno di sfere di alginato. Aggregazioni di condrociti con aspetto simile a condrone. TEM 5.400x

### INDAGINI BIOCHIMICHE -

La Fig. 7 mostra il trasporto di betaina in condrociti seminati in adesione ed ad alta densità cellulare (A) ed in condrociti coltivati all'interno delle sfere di alginato (B) sottoposti a trattamento iperosmolare a 500 mOsm (T) per 24 ore rispetto alle stesse colture mantenute in medium isosmolare (C). Tale analisi è effettuata a 6 giorni e 15 giorni di coltura per entrambi i sistemi colturali.

A 6 giorni di coltura, in entrambi i sistemi colturali, il trattamento iperosmolare induce una risposta adattativa che si esprime con elevato incremento del trasporto di betaina nelle cellule trattate rispetto ai controlli.

A tempi colturali più lunghi tale comportamento appare differente tra i due sistemi colturali. Mentre nei condrociti cresciuti su plastica l'incorporazione di betaina indotta dall'iperosmolarità è fortemente ridotta, nei condrociti cresciuti in sfere di alginato tale risposta si mantiene costante ed invariata anche a 15 giorni di coltura.



**Fig. 7:** Trasporto di betaina in condrociti cresciuti in adesione ed ad alta densità di semina (A) e in condrociti coltivati in alginato (B): entrambe le colture sono sottoposte a trattamento iperosmolare (500 mOsm) per 24 ore dopo 6 e 15 giorni di coltura.

## DISCUSSIONE

La caratterizzazione fenotipica del condrocita in coltura si basa sul mantenimento di aspetti morfologici e funzionali ben definiti da diversi autori (von der Mark, 1986, Benya et al., 1982). Un aspetto fondamentale è l'associazione di una morfologia rotondeggiante con la produzione di macromolecole tipiche della matrice cartilaginea.

Confrontando i risultati di nostri precedenti lavori (Borghetti et al., 1995) effettuati su condrociti coltivati ad alta densità, sono emersi i seguenti risultati. Le cellule coltivate in adesione mantengono caratteristiche fenotipiche morfofunzionali stabili almeno nella prima settimana di coltura: tali aspetti sono caratterizzati da coltura a pluristrato, con aspetti eterogenei delle cellule che si presentano sia di aspetto rotondeggiante che di aspetto allungato e con intensa produzione di matrice. La stabilità di tali caratteristiche fenotipiche è però fortemente influenzata dal prolungamento dei tempi di coltura per cui dopo due o più settimane o, a maggior ragione, in coltura secondaria si assiste ad un dedifferenziamento del condrocita contraddistinto dall'acquisizione di una morfologia fibroblastoide e dalla drastica riduzione della produzione di matrice extracellulare specifica (Borghetti et al., 1995).

Al contrario la coltura in alginato ha permesso, almeno nel periodo di tempo osservato nel presente lavoro (tre settimane), il mantenimento delle caratteristiche fenotipiche condrocitarie sopra descritte: morfologia rotondeggiante, produzione di matrice proteoglicanica e di collagene. Inoltre si è evidenziato che l'applicazione di tale sistema colturale permette il mantenimento o il realizzarsi di aspetti di organizzazione cellulare e di interazioni matrice-cellula simili a quelli descritti istologicamente o ultrasrtutturalmente per la cartilagine articolare:

- 1) le singole cellule od i gruppi di cellule producono matrice proteoglicanica che caratteristicamente si dispone spazialmente in zone sovrapponibili a quelle descritte nel tessuto, nelle immediate vicinanze della cellula (zona pericellulare) e progressivamente più distanti e tra le cellule appaiate (zona territoriale);
- 2) con l'aumentare del tempo di coltura si è osservato un aumento di dimensioni delle molecole proteoglicaniche, che tendono ad essere presenti anche in zone più distanti dalla pseudolacuna, all'interno dell'alginato;
- 3) il riscontro di fibrille verosimilmente di collagene in vicinanza di estroflessioni plasmacellulari è un aspetto morfologico descritto nel tessuto (Hunziker, 1992) e caratteristico della zona territoriale;
- 4) analogamente al tessuto si rinvengono gruppi di cellule circondate da matrice con caratteristiche morfologiche simili ai condroni.

Il dato biochimico relativo al trasporto di betaina in seguito a trattamento iprosmolare permette di fare alcune considerazioni. Nelle cellule coltivate in adesione, la riduzione della risposta adattativa specifica del condrocita all'iperosmolarità con l'aumentare del tempo colturale può essere soltanto legata a modificazioni morfologiche (acquisizione di morfologia fibroblastoide) intrinseche a tale sistema colturale ma potrebbe anche essere espressione della perdita del differenziamento fenotipico. Viceversa le cellule coltivate in sfere di alginato mantengono tale capacità di risposta. Ciò potrebbe rappresentare un ulteriore conferma e aspetto caratteristico della stabilità fenotipica in tale sistema

colturale. Inoltre l'utilizzazione del sistema tridimensionale offre la possibilità di studiare gli effetti dello stress osmotico sull'attività metabolica del condrocita anche per trattamenti prolungati o ciclici nel tempo simulando gli effetti delle situazioni meccaniche che si verificano *in vivo*.

### **TRIDIMENSIONAL CULTURAL SYSTEM TO STUDY THE DEGENERATIVE PATHOLOGY OF CARTILAGE *IN VITRO***

**SUMMARY.** A cultural system based on the entrapment of chondrocytes within alginate was studied. Microscopic and ultrastructural investigations confirmed that the chondrocytes maintained morphological (round shape, paired aggregation and/or chondrons-like structures) and functional (proteoglycan production in pericellular, territorial and interterritorial compartments) typical aspects of the cartilaginous tissue *in vivo*. Furthermore, the transport of a compatible osmolyte, the betaine, a process previously characterized in chondrocytes grown on plastic as a typical adaptive response of chondrocyte to the hyperosmolar treatment, was studied. In chondrocytes cultured on plastic, the uptake of betaine, induced by the hyperosmolar treatment, was evident within the first week of culture, then it tended to reduce; on the contrary in chondrocytes grown within alginate this response was still maintained after two week of culture.

**Key words:** Chondrocytes - Tridimensional culture - Alginate - Hyperosmolarity - Swine.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Benya P.D., Shaffer J.D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. (1982) *Cell*, **30**, 215-224.
2. Borghetti P., Della Salda L., De Angelis E., Maltarello M.C., Petronini P.G., Maraldi N.M., Cabassi E., Marcato P.S., Borghetti A.F.. Adaptive response to osmotic stress in pig articular chondrocytes. (1995) *Tissue & Cell*, **27**(2), 173-183.
3. Hauselman H.J., Russel J.F., Mok S.S., Schmid T.M., Block J.A., Aydelotte M.B., Kuettner K.E., Thonar E. J-M.A. (1994). Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell. Sci.*, **107**, 17-27.
4. Hunziker E.B.. Articular cartilage structure in human and experimental animals (1992). In Kuettner K.K., Schleyerbach R., Peyron J.G., *Articular cartilage and osteoarthritis.*, 1992, Raven Press, New York; 183-199.
5. Kuettner K.E., Pauli B.U., Gall G., Memoli V.A., Schenk R.K. (1982). Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics and morphology. *J.Biol. Cell.*, **93**, 743-750.
6. Solursh M, Linsenmayer T.F., Jensen, K.L.(1982) Chondrogenesis from single limb mesenchyme cells. *Dev.Biol.*, **94**, 259-264.
7. Thonar E. J-M. A., Buckwalter J.A., Kuettner K.E. (1986). Maturation-related differences in the structure and composition of proteoglycans

- synthesized by chondrocytes from bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2467-2474.
8. Thonar E. J-M. A., Lohmander L.S., Kimura J.H., Fellini S.A., Yanagishita, Hascall V.C. (1983). Biosynthesis of O-linked oligosaccharides on proteoglycans by chondrocytes from the Swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.*, **258**, 11564-11570.
  9. von der Mark K. (1986). Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. In: Kuhn K., Krieg T eds., *Rheumatology*, vol. 10, Basel:Karger, 1986; 272-315.

# NEOPLASIA EPATICA SECONDARIA NEL BOVINO

BERTOLLO F. M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana. Sezione di Arezzo.*

**Anamnesi:** bovino femmina di razza Chianina, di 9 anni, normalmente macellata. L'animale proveniente da allevamento di tipo familiare, in ottimo stato di nutrizione, nè durante la sua carriera (4 parti) nè alla visita pre macellazione ha messo in evidenza segni clinici degni di nota.

**Macellazione:** animale abbattuto con proiettile captivo in sede cranica. Dissanguamento, flusso e quantità, nella norma. Fegato modificamente aumentato di volume con nodosità biancastre multiple di vario volume.

Milza modificamente aumentata di volume con evidente stato iperplastico dei follicoli linfatici. Nessuna alterazione anatomo-patologica degna di nota a carico degli organi e parenchimi. Non è stato possibile fare alcun rilievo sul pancreas in quanto, con ogni probabilità, eliminato durante le operazioni di evisceramento.

## **Fegato**

### Quadro macroscopico.

L'organo, modificamente aumentato di volume, con margini arrotondati, mostra nel suo colorito di fondo normale, numerose nodosità biancastre, per lo più rilevate, a limite netto, di grandezza variabile da un grano di riso ad una arancia, di consistenza sodo-compatta. Le più grandi presentano una evidente depressione-ombelicatura centrale con cercine sfumato di colorito rosso-ematico (figure 1 e 2).

La superficie di taglio ripete il quadro macroscopico sopradescritto (figura 3).

Tutte le nodosità (figure 3 e 4) sono agevoli al taglio, mostrano limiti netti, hanno consistenza sodo-compatta, e risultano costituite uniformemente da un tessuto grigio-biancastro simil-leucemoide.

I linfonodi epatici sono modificamente aumentati di volume, sono tumidi, succosi, lievemente congesti.

### Quadro microscopico.

Nel parenchima epatico, ad una prima indagine istologica a piccolo ingrandimento, si notano numerose aree nodose basofile di varia estensione.

Ogni nodulo è composto da cordoni di cellule e da abbondante reazione desmoplastica intranodulare ma non perinodulare. I cordoni presentano un aspetto diverso a seconda della posizione che occupano nell'ambito del nodulo. Quelli più periferici appaiono più cellulari, con cellule molto stipate e ripetono l'aspetto istologico del carcinoma solido; quelli situati verso il centro appaiono a cellularità minore e mostrano più spazio tra cellula e cellula. In ambedue i casi le cellule mostrano rapporto nucleo-citoplasmatico a favore dei nuclei. Questi

ultimi presentano polimorfismo di grado medio e i nucleoli non sono molto prominenti. La cromatina appare in zolle prevalentemente addossate alla membrana nucleare. I limiti cellulari appaiono poco distinti. Le cellule mostrano forma prevalentemente rotondeggiante od ovoidale (aspetto prevalente nei cordoni alla periferia dei noduli), talvolta, però, si apprezza la presenza di prolungamenti citoplasmatici tali da conferire un aspetto simil-fusato o stellato (aspetto rilevato nei cordoni al centro dei noduli). Il numero di mitosi per campo (40x) è più elevato nelle zone periferiche del nodulo (fino a 6-7) rispetto alle zone più centrali (fino a 2-3).

La reazione desmoplastica intranodulare appare più abbondante nel centro del nodulo ed è formata da tessuto connettivo di aspetto edematoso.

Al limite nodulo-parenchima si apprezza chiaramente la crescita centrifuga della proliferazione neoplastica, e nel parenchima limitrofo si colgono quadri atrofici conseguenti a patosi meccanico-compressiva. Nelle porzioni più periferiche dei noduli è frequente il ritrovamento di gruppi o singoli epatociti, rappresentanti residui di parenchima disorganizzato dalla crescita neoplastica infiltrante e dalla fibroplasia.

Unica lesione rilevata nel parenchima epatico indenne da neoplasia è stata la presenza di lacune teleangectasiche.

Il linfonodo portale appare istologicamente normale; si rilevava assenza di follicoli secondari e un modico stato di deplezione linfocitaria nella paracorticale.

**Conclusioni:** possiamo sicuramente fare diagnosi di Carcinoma secondario del fegato, anche se all'esame ispettivo non si è potuto avere nessun riscontro del pancreas con molta probabilità quadri simili si osservano come metastasi da neoplasie primitive del pancreas. La nostra comunicazione non ha pretese anatomo-isto-patologiche in quanto in letteratura (vedi scuola di Bologna) esistono segnalazioni, illustrazioni ed interpretazioni anatomi-patologiche ben precise sull'argomento. Pertanto questo lavoro ha solo un aspetto di indagine statistica negli animali macellati in tutta la provincia di Arezzo. Infatti da indagini condotte questo sembra risultare il primo casi di Neoplasia secondaria nei bovini.



Figura 1: Fegato bovino, organo modicamente aumentato di volume, con margini arrotondati, cosparsi di nodosità biancastre di varia grandezza.



Figura 2: Fegato bovino, nel particolare meglio risultano le nodosità di grandezza variabile da un chicco di riso ad un'arancia. Le nodosità più voluminose risultano sopraelevate, depresse e con un cerchio sfumato di colorito rosso ematico.



Figura 3: Fegato bovino, la superficie di taglio ripete il quadro esterno dato da nodosità biancastre a limite netto, di varia grandezza.



Figura 4: Fegato bovino, nella sezione la nodosità appare a limite netto di colorito grigio biancastro simil leucemoide.

# **RUOLO BIOLOGICO DELLE MOLECOLE DI ADESIONE**

GALEOTTI M.

*Unità di Patologia Comparata  
Dipartimento di Scienze della Produzione Animale - Università di Udine.*

## **INTRODUZIONE**

L'adesione è l'interazione di un recettore molecolare di superficie di una cellula con un altro recettore cellulare o con un ligando immobilizzato.

L'adesione è un processo secondario che avviene dopo un riconoscimento "ben riuscito" e che successivamente comporta cambiamenti nell'espressione dei geni nella organizzazione del citoscheletro.

Le molecole di adesione sono coinvolte in importanti fenomeni biologici come l'organogenesi, l'infiammazione, l'immunità e i tumori.

Esistono dei criteri di selezione per inserire una molecola nel novero delle molecole di adesione: 1) la sequenza primaria della molecola deve essere conosciuta; 2) la molecola deve incrementare l'affinità di una cellula per un'altra cellula e/o per la matrice extracellulare; 3) l'espressione artificialmente indotta di una molecola di adesione putativa su una cellula, deve conferire un nuovo fenotipo di adesione; 4) questa nuova funzione deve essere inibita da un anticorpo specifico.

Difficoltà insorgono dal fatto che poche molecole di adesione hanno solo la funzione di incrementare l'affinità di una cellula per un'altra. Un gran numero di queste molecole ha infatti anche un ruolo nei segnali tra cellule, e diventa spesso complicato comprendere quale è la funzione prevalente di una data molecola.

La maggioranza delle molecole di adesione sono state classificate in quattro famiglie: Caderine, Integrine, Selectine e Immunoglobuline. Esistono poi molecole orfane con classificazione ancora incerta.

## **FAMIGLIA DELLE CADERINE**

Le caderine sono proteine di membrana presenti sulla superficie cellulare, che mediano l'adesione Ca-dipendente cellula-cellula in una grande varietà di tessuti e di specie. Le caderine classiche sono un gruppo di proteine integrali di membrana, che si è ben conservato nell'evoluzione delle specie. Nell'uomo ne sono state identificate 11 (tutte caratterizzate da un alto grado di omologia a livello amminoacidico). Sono state identificate anche in molti mammiferi, negli uccelli, negli anfibi e negli insetti. Una stessa caderina può indifferentemente fungere da ligando e da recettore (adesione omotipica), oppure una caderina può comportarsi da ligando per una diversa caderina che ne diventa il recettore (adesione eterotipica).

Da un punto di vista funzionale le caderine: a) mediano l'adesione omotipica o eterotipica cellula-cellula; b) agiscono come recettore e ligando; c) sono responsabili dell'adesione selettiva tra cellule e dello "smistamento" cellulare; d)

rivestono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità di strutture multicellulari.

La loro espressione varia considerevolmente durante lo sviluppo e questo è sicuramente alla base dei fenomeni di migrazione delle cellule embrionali. Molti tipi cellulari esprimono molte sub classi di caderine contemporaneamente, tanto che si suppone che le proprietà adesive di singole cellule siano governate da una varia combinazione di caderine; inoltre sono coinvolte nell'invasione e nella metastatizzazione neoplastica. Esempi che giocano a favore di questo sono la prova che una aumentata espressione di caderine rende una cellula neoplastica meno invasiva, mentre la ridotta espressione o la perdita di attività delle caderine (per alterazione nella struttura) le rende più invasive. Alto potenziale invasivo e alta capacità di dare metastasi sono proprie anche di quei tumori poco differenziati con bassa espressione di caderine. Ancora, una espressione instabile di caderine oppure una aberrante attività di queste è spesso associata a un forte potenziale metastatico della neoplasia. E' peraltro vero che la perdita completa delle caderine sulla superficie cellulare non è sufficiente per rendere le cellule invasive.

### **FAMIGLIA DELLE INTEGRINE**

Le integrine sono glicoproteine intramembranarie eterodimeriche espresse su diversi tipi cellulari, considerate i maggiori recettori per la matrice extracellulare ed importanti molecole di adesione tra cellula e cellula

Dal punto di vista strutturale consistono di due subunità non covalentemente associate: a e b . Esistono 12 differenti subunità a e 8 subunità b . Subunità individuali a sono associate con più di un tipo di subunità b .

Si suddividono in 3 subfamiglie:

Integrine b 1 o proteine VLA

Integrine b 2 o leucams

Integrine b 3 o citoadesine

Le subunità b mostrano tutte una forte omologia, quasi del 50%, nella composizione aminoacidica. Le subunità a mostrano scarsa omologia nella sequenza aminoacidica, la porzione N-terminale contiene 3 o 4 siti di legame cationici.

Come molecole di adesione, le integrine rivestono un ruolo importante in numerosi processi biologici, quali: 1) migrazione dei tessuti durante l'embriogenesi; 2) infiammazione; 3) funzione immune; 4) riparazione delle ferite; 5) metastasi tumorale; 6) aggregazione piastrinica. Le integrine si legano con una vasta gamma di proteine della matrice extracellulare, tra le quali la laminina, il collagene, la trombospondina e la vitronectina. Si legano, inoltre, in maniera selettiva ai membri della superfamiglia delle Immunoglobuline: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1.

### **FAMIGLIA DELLE SELECTINE**

La sequenza proteica di queste molecole è stata ottenuta solo nel 1989.

Dal punto di vista strutturale sono costituite da 3 tipi di domini:

1° una parte N-terminale, costituita da una lectina Ca dipendente;

2° un dominio simile all' "epidermal growth factor" (EGF);

3° domini ripetuti di "complement regulatory proteins" (CRP).

Le selectine conosciute sono 3 (tab. 1). La forte omologia esistente fra le tre selectine, suggerisce un'origine da un gene ancestrale comune con successive diversificazioni dell' exone.

Tab. 1. Classificazione delle selectine conosciute

Selectin	- Earlier	- Expressed by	- target cell
L-selectin	MEL-14, LAM-1, LEU-8, TQ1, LECAM-1 DREG.56 CD62	PMNs, monocytes, lymphocyte subset, malignant leukocytes	High EC venules of lymph nodes, activated systemic ECs, MECA-79
E-selectin	ELAM-1 LECAM-2 CD62E	Cytokine- activated endothel	Sialyl- Lewis A. PMNs, monocytes, lymphocyte subset
P-selectin	GMP-140, PADGEM LECAM-3 CD62P	Rapidly- activated ECs, platelets megakaryoc.	Sialylated lactosamino- glycans, PMNs, monocytes, lymphocyte subset

E' ormai chiaro il loro coinvolgimento nella risposta infiammatoria, tanto da indicarle come probabili nuovi "target" terapeutici. Sono coinvolte nella fase precoce della cascata di eventi che portano alla fuoriuscita dei leucociti dai vasi (Fig. 2). Alle selectine è legato il fenomeno del "rolling", letteralmente il rotolamento dei leucociti sull'endotelio attivato. Il "rolling" richiede una interazione tra un recettore endoteliale e un contro-recettore sul leucocita in movimento. Questa interazione deve rompersi rapidamente e il ciclo ripetersi, altrettanto rapidamente. La struttura delle selectine garantisce queste rapide interazioni. La presenza di segmenti ripetuti conferisce alto grado di flessibilità alla molecola. Il residuo lectinico permette il legame a molecole di carboidrati presenti sulle cellule endoteliali. I ligandi carboidratici sono presenti in catene flessibili, questo permette alle selectine e ai ligandi carboidratici di adattarsi rapidamente alla nuova posizione assunta dalla cellula.

L'espressione sequenziale di P-selectina e di E-selectina consente l'inizio della cascata dell'adesione. P-Selectina, conservata nei corpi di Weibel-Palade, è rapidamente espressa in superficie (Fig.2). E-Selectina (ELAM-1) è una molecola inducibile sulla superficie endoteliale (Bevilacqua; Science, 1989), media l'adesione di neutrofili e di cellule T (CD4+ resting) (Shimizu; Nature, 1991).

#### **SUPERFAMIGLIA DELLE IMMUNOGLOBULINE (IgSF)**

Il concetto di IgSF è stato proposto nel 1982, da allora comprende oltre 70 membri. Il ruolo fondamentale di queste molecole è il controllo del

comportamento cellulare. Tale controllo è esercitato da molecole che agiscono come recettori, traducendo un segnale, o come molecole di adesione intercellulare, o in entrambi i modi. Molti dei membri della IgSF sono presenti sulla superficie cellulare anche se esistono isoforme solubili. La superfamiglia si divide in due gruppi maggiori:

- 1) un gruppo è specializzato per il riconoscimento specifico dell' antigene. Fra i suoi membri il BCR (immunoglobuline), il TCR e gli antigeni MHC.
- 2) l' altro gruppo include strutture di riconoscimento della superficie cellulare che non sono antigene-specifiche:

<i>IgSF</i>	<i>ligandi</i>
LFA-2 (CD2)	LFA-3 (CD58)
CD4	MHC class II
CD8	MHC class I
ICAM-1 (CD54)	LFA-1, MAC-1, CD43
ICAM-2	LFA-1
ICAM-3	LFA-1
LFA-3 (CD58)	CD2
VCAM-1 (CD106)	VLA-4 (Integrina alfa4-B1)
PECAM-1 (CD31)	PECAM-1 (altro?)
NCAM (CD56)	NCAM, eparan solfato,

eparina.

Vengono di seguito riportate in modo schematico le caratteristiche di due tra le più importanti molecole di adesione della IgSF.

### **ICAM-1 (CD54)**

*Distribuzione cellulare* : Normalmente è espressa in discreta quantità su un limitato numero di cellule come monociti, granulociti e cell. endoteliali. Può essere indotta o “up” regolata su molte cellule B, T, timociti, cell. dendritiche, cell. endoteliali, fibroblasti, cheratinociti, condrociti e cell. epiteliali.

*Funzione* : E' fondamentale nella regolazione della risposta immune e infiammatoria. Media l' adesione delle cell. T con le APCs o con cell. target. E' coinvolta nell' adesione cell. T/T e cell. T/B. Il legame con ICAM- 1 ha effetto costimolatore sull' attivazione cell. T. E' importante nell' adesione di monociti, linfociti e neutrofilii all' endotelio attivato. L' espressione dell' ICAM- 1 è implicata nel processo metastatico.

### **VCAM-1 (CD106)**

- *Distribuzione cellulare* : cellule endoteliali attivate, macrofagi tissutali, cellule dendritiche, fibroblasti del midollo osseo, mioblasti.

- *Funzioni* : Coinvolta nell' adesione di linfociti, monociti ed eosinofili su endoteli attivati. Reclutamento dei leucociti nel sito infiammatorio. Coinvolta nell' interazione di linfociti e cell. dendritiche. Media l' adesione delle cellule mielomatose alle cell. endoteliali, è quindi coinvolta nel processo metastatico.

- *Regolazione dell' espressione* : E' indotta da IL1, IL4, TNFalfa, IFNgamma.

- *Ligandi* : Integrina alfa4/beta1 (VLA-4), integrina alfa4/beta7, entrambe linfocitarie.

Anticorpi anti-VCAM-1 inibiscono l' adesione dei linfociti T a cellule endoteliali TNF-stimolate.

## HOMING LINFOCITARIO

Nella Fig. 1 vengono schematicamente rappresentate le varie tappe che caratterizzano il fenomeno definito "homing" linfocitario, con il coinvolgimento delle varie molecole di adesione che di volta in volta lo regolano.

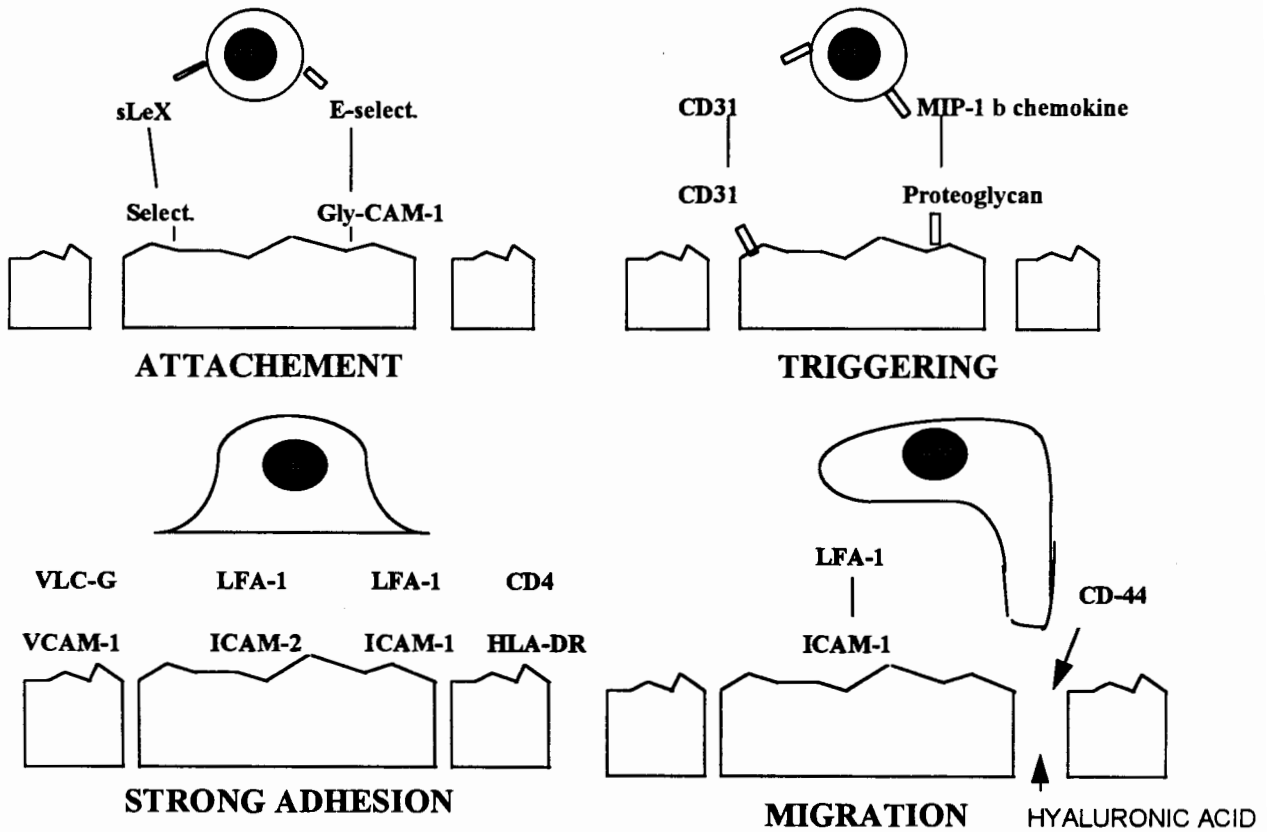


fig. 1. Le varie tappe che regolano l' homing linfocitario

## ADESIONE DEI GRANULOCITI

Le varie tappe che regolano l'adesione dei granulociti ad un endotelio soggetto ad infiammazione sono riportate schematicamente nella Fig. 2.

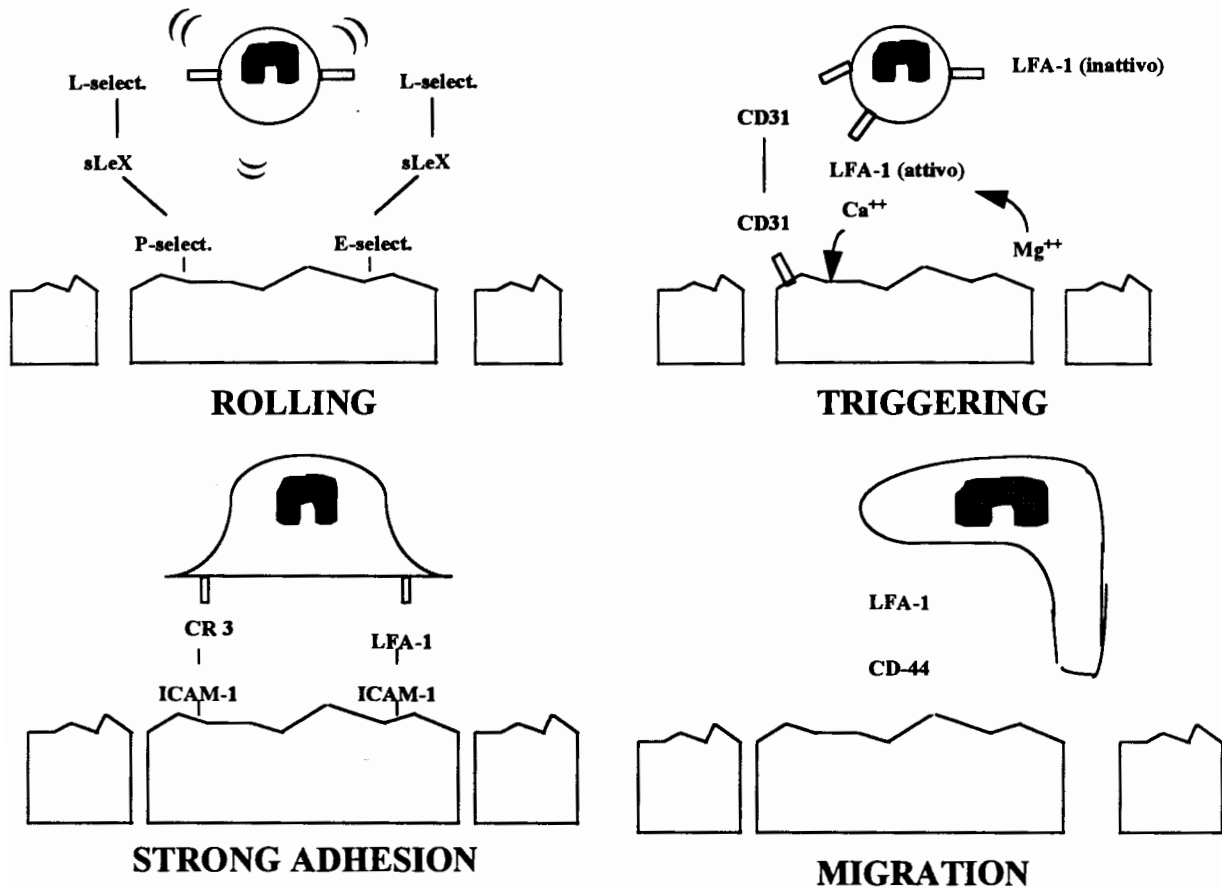


Fig. 1. Le varie tappe che regolano l'adesione dei granulociti ad un endotelio soggetto ad un processo infiammatorio

### ESPRESSIONE DI MOLECOLE DI ADESIONE IN CELLULE ED ENDOTELI DI TESSUTI NORMALI E SOGGETTI AD INFIAMMAZIONE NEL BOVINO, CANE E GATTO

L'identificazione di molecole di adesione nei tessuti di animali è limitata dallo scarso numero di anticorpi specifici esistenti. Nella letteratura sono, infatti, pochi i lavori sulla preparazione di anticorpi contro molecole di adesione di specie animali che non siano il topo o il ratto. Altresì sono disponibili molti anticorpi verso molecole di adesione dell'uomo. In questa indagine preliminare sono stati scelti alcuni anticorpi monoclonali, gentilmente messi a disposizione da due ditte (Immunotech, S.A., Delta Biologicals Roma; Sambio-Monosan, S.p.A. - BIO DIVISION, Milano), per tentare di identificare molecole di adesione in tessuti di bovino, cane e gatto. Gli anticorpi utilizzati sono rispettivamente l'anti-ICAM-1 (84H10), VCAM-1 (1G11) della Immunotech, e l'anti-ICAM-1 (MEM111), E-selectina (ENA1), Endogлина (PN-E2), E-caderina (6F9), della Sambio-Monosan. E' stato inoltre utilizzato un anticorpo monoclonale anti-MHC Classe II DR della VMRD di Washington (USA). Tutti gli anticorpi sono stati utilizzati

su tessuti congelati, mediante una tecnica immunocitochimica classica, che prevede in breve: preincubazione, incubazione dell'ab. primario per 2 h, anticorpo secondario biotinato, complesso biotina-avidina-fosfatasi, cromogeno con evidenziazione in rosso dell'avvenuta reazione. Le prove effettuate sullo stesso materiale, fissato in formalina, non hanno fornito nessuna positività. I risultati ottenuti sono riportati nella tabelle 2 e 3.

**Tab. 2. Identificazione di molecole di adesione e m.a. accessorie in cellule ed endoteli linfonodali**

mAbs	VENULE / ARTERIOLE	HEV	LINFOCITI	MACROFAGI	IDC
ICAM-1 (I)	(-) b (cute)	(-) b	(-)	(-)	(-)
VCAM - 1 (I)	(-) b (mil.) (+) c	+ c	+ c (alcuni)	n.t.	n.t.
E- SELECT. (S)	(-) b + c (-) g	(-) b + c (-) g	(-) b ++/+++ c (num.) (-) g	(-) b n.t. c n.t. g	(-) b ++/+++ c n.t. g
ENDOGL (S)	(-) c (+) g	(-) b (+) g	(-) c (-)g	(-) c (-) g	(-) c (-) g
MHCII DR (VMRD)	+b (-) c	+b (-) c	++b + c	+++b n.t.	+++ b +++ c n.t.g

I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research Development; b = cane; g = gatto; n.t. = non testato; (-) = negativo; (+) = incostante; + = debole; ++ = media; +++ = forte positività

**Tab. 3. Identificazione di molecole di adesione e m. a. accessorie in cellule ed endoteli reattivi e in tessuti flogistici**

mAbs	VENULE / ARTERIOLE	HEV	LINFOCITI	MACROFAGI
ICAM-1 (I)	(-) b	(+) b (-) g	++ b (scarsi) (-) g	++ b
VCAM - 1 (I)	(-) b (+) c (cute) (+) g (cute)	(-) b (-) c (-) g	(-) b (-) c + g ?	(-) b (-) c + g ?
E- SELECT. (S)	+ c (cute) (+) g (cute)	- (-) g	(-) g	(+) g ?
ENDOGL (S)	(-) c ++/+++ g	(-) c N.T. g	n.t. c (-) g	N.V. c (-) g
MHCII DR (VMRD)	++ b (-) g (-) c + b (cute)	++ b (-) c (-) g	+++ b ++ c + g	+++ b (cute) +++ b (+) g

I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research Development; b = c = cane; g = gatto; n.t. = non testato; (-) = negativo; (+) = incostante; + = debole; ++ = media; +++ = forte positività

Da questa esperienza preliminare si evince che utilizzando l'anti ICAM-1 l'evidenziazione della molecola è molto scarsa in tutte e tre le specie, tranne che per i linfociti di bovino, così come per l'anti VCAM-1 dove solo nel gatto si osserva una debole positività linfocitaria e macrofagica. Con l'anti-E-selectina si riesce ad evidenziare positività soltanto nel cane, sia a livello endoteliale, ma soprattutto di linfociti e di cellule IDC linfonodali. Il monoclonale anti-Endoglina marker di attivazione endoteliale, manifesta forte positività per le strutture endoteliali del gatto, con un forte incremento della reazione negli endoteli di venule ed arteriole di tessuti flogistici. L'antiMHC di Classe II evidenzia forte espressione della molecola negli endoteli di bovino, come riportato in un precedente lavoro (Galeotti et al., 1993), e assenza di reazione nelle strutture endoteliali del cane e del gatto.

### **ESPRESSIONE DI MOLECOLE DI ADESIONE NELLE NEOPLASIE MAMMARIE DEI CARNIVORI DOMESTICI**

L'espressione di molecole di adesione è evento cruciale nel processo di trasformazione neoplastica nell'uomo, nell'invasione dei tessuti circostanti da parte delle cellule tumorali e nella metastatizzazione. La cascata metastatica è un processo multiplo, che coinvolge l'attacco di cellule tumorali all'endotelio

vascolare, seguito dalla retrazione o distruzione delle cellule endoteliali e dalla migrazione delle cellule tumorali dentro la matrice subendoteliale. Per molti aspetti questo processo è equivalente alla fuoriuscita di leucociti nel sito infiammatorio. E' stato dimostrato che cellule metastatiche mostrano preferenza nell'adesione alle cellule endoteliali di alcuni organi, suggerendo che il riconoscimento cellula neoplastica/cellula endoteliale possa giocare un ruolo importante nella formazione di metastasi in siti specifici. Fra le molte molecole di adesione coinvolte nel processo neoplastico, l'espressione di ICAM-1 sulle cellule tumorali è stata correlata con un aumento di rischio di progressione del tumore e con la formazione di metastasi. Alcuni tumori dell'uomo, come il melanoma e l'osteosarcoma, usano la VCAM-1 per l'adesione alle cellule endoteliali, mentre le cellule metastatiche del cancro del colon effettuano l'adesione mediante le selectine.

Appare di estremo interesse lo studio dell'espressione delle molecole di adesione anche nelle neoplasie animali, con il duplice aspetto di indagine comparativa per l'uomo, e di individuazione di markers di validità prognostica.

Vengono qui riportati i dati preliminari ottenuti da una indagine effettuata per valutare la possibilità di identificare molecole di adesione nelle neoplasie del cane e del gatto, utilizzando anticorpi specifici per l'uomo. Gli anticorpi utilizzati sono quelli riportati nel paragrafo precedente, le modalità di esecuzione delle prove e di conservazione dei tessuti sono le stesse. Nella tabella 4 sono riportati i dati ottenuti per le neoplasie mammarie e per il carcinoma squamoso della cute del gatto, mentre nella tabella 5 sono riportati i dati riguardanti la mammella normale e le neoplasie mammarie del cane.

**Tab. 4. Espressione di molecole di adesione nelle neoplasie mammarie e nel carcinoma squamoso della cute del gatto**

	<b>CELL. CARCINOM.</b>	<b>TESS. CONN. INTERSTIZ.</b>	<b>MACR. E LINF. INF.</b>	<b>VASI</b>
<b>ICAM-1 (I)</b>	(-) m.c.m (-) c.m	(+)/+	(-) c.s.c.	(-) c.s.c.
<b>VCAM - 1 (I)</b>	(-) m.c.m (-) c.m	(-)	+ c.s.c.	(+) c.s.c. (+) m.c.m.
<b>E- SELEC. (S)</b>	(-) m.c.m (-) c.m	(-) m.c.m (-) c.m	(+) c.m. + c.s.c.	(-) HEV c.s.c. (+) picc. vasi c.s.c. (-) c.m.
<b>ENDOGL. (S)</b>	(-)	(-)	(-)	++/+++ c.s.c ++/+++ m.c.m.
<b>MHCII DR (VMRD)</b>	(-) m.c.m. (-) c.s.c. (-) c.m.	(-) m.c.m. (++) c.m.	N.T.	N.T.

**c.m. = carc. mammario; c.s.c. = carc. squamoso cute; m.c.m. = metastasi carc.**

**I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research**

**Tab. 5. Espressione di molecole di adesione nella mammella normale e nelle neoplasie mammarie del cane**

	ALVEOLI E DOTTI	IPERPLASIA LOBULARE	CELL. CARCINOM.	CELL. MIOEPITEL.	TESS. CONNET. INTERSTIZ.	MACROFAGI E LINFOCITI	VASI
<b>ICAM-1 (I)</b>	(-)	(+)+	(-)	(-)	++	(-)	(-)
<b>ICAM-1 (S)</b>	N.T.	N.T.	(-)	(-)	+++	(-)	(-)
<b>VCAM - 1 (I)</b>	(-)	(+)+	+ (?)	(+)	+	+ (?)	(+)
<b>E- SELECT. (S)</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)+
<b>ENDOGL. (S)</b>	N.T.	N.T.	(-)	(-)	(-)	N.V.	(-)
<b>E-CAD. (S)</b>	(-)	(-)	(-)/(+)	(-)	(+)/(?)	(-)	(-)
<b>MHC II DR (VMRD)</b>	(+)+	(+)+	(-)/(+)	+ / ++	+++ / +++	++	(-)

**I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research**

Nel gatto gli anticorpi testati non mostrano alcuna positività, se si eccettua una debole reazione della VCAM-1 per gli endoteli vasali, e una forte positività dell'anticorpo anti-endoglina per gli endoteli dei piccoli vasi del carcinoma squamoso della cute e per quelli contenuti nelle metastasi di carcinoma mammario nel linfonodo. Nel cane si ha una discreta espressione di ICAM-1 a livello di tessuto connettivo interstiziale delle neoplasie. L'espressione della VCAM-1 sembra essere incostante un po' a tutti i livelli della neoplasia, mentre si apprezza una positività costante della E-selectina per gli endoteli. Interessante il dato che scaturisce con il monoclonale anti-MHC di Classe II (DR): colora debolmente, ma in modo costante, gli alveoli e i dotti della mammella normale e in modo più incostante i lobuli iperplastici, non colora le cellule carcinomatose dei vari tipi di neoplasia. Colora in modo marcato le cellule del connettivo interstiziale. Inoltre fornisce reazione positiva anche per le cellule mioepitaliali, anche se in modo più debole rispetto al connettivo, e per le numerose cellule macrofagiche (IDC) e alcuni linfociti nel contesto della neoplasia.

I dati ottenuti per l'MHC di Classe II, anche se preliminari, sono raffrontabili con quelli ottenuti nel carcinoma mammario della donna. I dati che si ottengono dall'uso degli altri anticorpi sembrerebbero indicare una generale scarsa cross-reattività per le molecole di adesione delle specie testate. Fanno eccezione il monoclonale per la E-selectina che fornisce una discreta positività nel cane, e quello per la Endoglina che evidenzia una forte espressione della molecola nel gatto.

Questi dati, assieme a molti altri presenti nella letteratura, avvallano l'utilizzo di anticorpi specifici per l'uomo nello studio dell'espressione delle molecole di adesione nei vari processi patologici degli animali domestici ed esortano nella prosecuzione delle indagini in un settore di così grande interesse per la patologia comparata.

# IL DANNO PROTEICO OSSIDATIVO COME MECCANISMO DI MORTE CELLULARE NELL'IMMUNODEFICIENZA DI ORIGINE LENTIVIRALE

PIEDIMONTE G.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Messina.*

Lo stress ossidativo è stato chiamato in causa per spiegare l'origine di varie condizioni morbose. per stress ossidativo in senso stretto si deve intendere una condizione patologica della cellula caratterizzata da uno squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, comunemente abbreviato in "ROF") e sistemi antiossidanti cellulari. Questi ultimi sono rappresentati da un insieme complesso di sistemi enzimatici, capaci di liberare la cellula dai radicali dell'ossigeno e/o di proteggere la cellula dagli effetti negativi di questi. Bersagli molecolari del danno ossidativo sono il DNA, le proteine ed i lipidi cellulari.

Il danno ossidativo è stato recentemente proposto come meccanismo patogenetico della morte cellulare nell'AIDS. Il meccanismo che lega danno ossidativo e morte apoptotica non è stato però chiarito, nemmeno in forma ipotetica, da coloro che hanno formulato l'ipotesi. Questi si sono limitati a fornire un elenco dettagliato delle condizioni morbose in cui morte apoptotica e stress ossidativo si associano, concludendo che, siccome nella progressione dell'AIDS i due fenomeni tendono ad associarsi, è verosimile che anche questa malattia possa fare parte dell'elenco delle malattie da stress ossidativo. Come si può facilmente dedurre, il ragionamento che sottende tale proposta patogenetica è di tipo analogico e si basa su valutazioni della frequenza con cui i fenomeni si rivelano. (Per un approfondimento del problema v. le ref. 1 e 2).

Il nostro gruppo di ricerca ha cercato di riproporre l'ipotesi in questione presentandola in termini di meccanismi molecolari di malattia. Il nostro ragionamento è il seguente:

- a) se davvero lo stress ossidativo ha un ruolo nella morte cellulare apoptotica questo evento deve verificarsi in linfociti attivati. Infatti, in primo luogo, è questo il tipo di cellula che tende a diminuire costantemente nell'evoluzione della malattia; in secondo luogo il linfocito deve rientrare in ciclo perchè si attivino programmi di morte apoptotica; infine solo l'attivazione di alcuni cicli metabolici è una condizione indispensabile perchè si abbia la produzione di radicali liberi dell'ossigeno;
- b) se lo stress ossidativo si manifesta realmente in queste cellule, vi deve essere una sostanziale differenza nel bilancio redox tra linfociti di soggetti sani e quelli di soggetti HIV e/o FIV positivi, visto che la deplezione apoptotica riguarda solamente questi ultimi;
- c) se il bilancio redox è alterato a qualche livello, si deve poter dimostrare una forma di danno molecolare, tipicamente ossidativa, dopo attivazione linfocitaria.

Con queste premesse abbiamo svolto una complessa sperimentazione, che coinvolge l'uso di modelli umani e felini di AIDS, i cui risultati sono elencati nella tabella allegata, che ci hanno condotto alla conclusione che il **danno maggiore sofferto dai linfociti di soggetti sieropositivi dopo attivazione linfocitaria è a carico delle proteine cellulari. Queste sono ossidativamente modificate e degradate pur essendo la velocità di sintesi iniziale per niente modificata. La conseguenza maggiore dell'insieme di tali fenomeni è che i linfociti di soggetti malati effettuano il passaggio da una fase all'altra del ciclo senza mai raggiungere la massa proteica tipica della fase G1 tardiva che consente una mitosi corretta.**

Noi proponiamo che il meccanismo con cui il danno ossidativo porta alla morte apoptotica coinvolge la perdita del controllo proliferativo da massa critica con il conseguente aumento dell'incidenza di mitosi letali. L'aumento delle mitosi letali (che si concludono con la morte invece che con la divisione cellulare) è un meccanismo noto da tempo agli studiosi del ciclo cellulare (3) che a nostro parere non si differenzia affatto dalla morte apoptotica. L'incidenza di tali mitosi letali aumenta fortemente ogni volta che una cellula effettua la transizione di fase in modo inappropriato cioè quando non è passata attraverso le tappe metaboliche tipiche della fase precedente (4).

In conclusione noi pensiamo che la morte cellulare nell'AIDS sia il risultato dell'alterazione di meccanismi di controllo della crescita cellulare e in particolare del mancato funzionamento di specifici punti di controllo del ciclo cellulare.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Buttke TM e Sandstrom PA: Oxydative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, 1994, 15:7-10.
2. Droge W, Eck HP e Mihm S: HIV induced cysteine deficiency and T cell dysfunction: a rationale for treatment with N-acetylcysteine. *Immunology Today*, 1994, 214:211-213.
3. Murray A: Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell*, 1995, 81:149-152.
4. Heichman KA e Roberts JM: Rules to replicate by. *Cell*, 1994, 79:557-562.

Danno proteico in linfociti di sangue periferico durante la fase asintomatica dell'immunodeficienza da HIV e FIV.

<b>GATTO FIV+</b>	<b>UOMO HIV+</b>
<p><b>La sintesi di proteine, stimolata dopo attivazione linfocitaria, aumenta ma la vita media delle proteine neosintetizzate è fortemente ridotta. La cellula ha un contenuto normale di MnSOD ed una produzione normale di IL-2 che pare presentare una normale attività.</b></p>	<p>Il comportamento del macchinario protido-sintetico è analogo. La MnSOD è indotta e l'IL-2 perde in attività biologica.</p>
<p><b>La concentrazione intracellulare in gruppi carbonilici rimane inalterata dopo attivazione linfocitaria.</b></p>	<p>La concentrazione di gruppi carbonile aumenta fortemente in soggetti HIV+.</p>
<p><b>Il sistema degradativo ATP-ubiquitina dipendente sembra attivato.</b></p>	<p>Il sistema degradativo ATP-ubiquitina dipendente sembra attivato.</p>
<p><b>L'ossidazione proteica misurata come aumento di carbonili proteici non si modifica in linfonodi di gatti FIV+ asintomatici.</b></p>	<p>Non sono stati eseguiti studi analoghi nell'uomo.</p>
<p><b>L'aumento dei carbonili proteici è significativo nel cervello di gatti FIV+ asintomatici.</b></p>	<p>Non sono stati eseguiti studi analoghi nell'uomo.</p>
<p><b>La transizione di fase G1/S nel ciclo cellulare dei linfociti attivati avviene senza che le cellule raggiungano la massa proteica critica per la transizione.</b></p>	<p>Linfociti HIV+ si comportano in modo analogo solo che il fenomeno è un po' meno marcato.</p>

# **DISTRIBUZIONE DEL DNA PROVIRALE DEL VIRUS VISNA-MAEDI IN POLMONI NATURALMENTE INFETTI**

Sanna E., Woodall C.\*, Leoni A., Nieddu A.M., Pirino S.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Università  
di Sassari*

*\* Department of Veterinary Pathology - Università di Edimburgo*

## **RIASSUNTO**

Allo scopo di rivelare il DNA provirale di Maedi-Visna Virus (MVV) su polmoni ovini con infezione naturale in atto, sono stati utilizzati campioni inclusi in paraffina provenienti da n. 2 pecore positive all'AGID test per Maedi, che presentavano all'esame istologico tipici quadri di polmonite linfoproliferativa interstiziale. Su di essi sono state eseguite prove di ibridazione in situ (i.s.h.) mediante sonda a DNA sintetizzata in PCR, specifica per un segmento di 291 bp del tratto LTR del genoma provirale; la sonda, marcata con digoxigenina, è stata rivelata con sistema antiDIG-AP-NBT.

L'i.s.h. ha consentito di rilevare, in entrambi i casi, segnali forti e regolari localizzati in pneumociti II, epitelii bronchiali e macrofagi. Nei primi i segnali sono stati osservati esclusivamente nel nucleo, mentre i macrofagi hanno manifestato aree positive anche in sede citoplasmatica.

I risultati ottenuti inducono a ritenere che il virus, attraverso l'integrazione della quota provirale in cellule dotate di capacità moltiplicativa, persegua anche una strategia di amplificazione, oltre che di diversificazione genica imputabile all'"infedeltà" della sua trascrittasi inversa

## **INTRODUZIONE**

Nello studio della polmonite lentivirale degli ovini (Maedi), numerosi AA. hanno indagato la presenza e la distribuzione cellulare dell'agente eziologico mediante tecniche di ibridazione in situ atte a rivelare l'RNA virale. Sono state così identificate le cellule-bersaglio dell'infezione e i citotipi primariamente coinvolti nel mantenimento della stessa. Minore interesse è stato invece dedicato al DNA provirale. Il virus Maedi, come gli altri retrovirus, possiede infatti la capacità di "trascrivere" il genoma e di permanere "quiescente" fino a quando le condizioni per la sintesi di proteine transattivanti e per la ricostruzione del virione completo non siano ottimali. Questo particolare meccanismo di "attesa", oltre alla possibilità di mutazioni che interverrebbero nelle complesse fasi trascrizionali e ritrascrizionali, è indubbiamente alla base del lungo decorso della malattie lentivirali e rende ragione della intrinseca pericolosità degli agenti eziologici che, grazie ad esso, riescono anche a costituire una "riserva" inaccessibile alle difese.

Poichè l'entità e l'esatta localizzazione della "pars" trascritta e, conseguentemente, la rilevanza del "serbatoio" polmonare in corso di infezione naturale da MVV non risulta sufficientemente acclarata, ci è parso interessante

procedere a prove specifiche per la rilevazione del DNA provirale su campioni con infezione naturale in atto, nel tentativo di confermarne innanzitutto l'integrazione nucleare e, in secondo luogo, di verificarne la distribuzione cellulare.

## **MATERIALI E METODI**

### **Scelta dei campioni**

Dalla collezione dell'Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Sassari, venivano prescelti blocchi in paraffina ottenuti da polmoni di n.2 ovini positivi all'AGID test per MVV. All'esame istologico essi presentavano le lesioni caratteristiche della Maedi (linfoproliferazioni nodulari, polmonite interstiziale, iperplasia linfoide peribroncovascolare, iperplasia della muscolatura liscia).

### **Produzione e marcatura della sonda**

Il DNA (MVV str. WLC-1) veniva estratto in fenolo-cloroformio e precipitazione in etanolo. Veniva prescelta una coppia di primers adatta all'amplificazione di un segmento breve (291 bp) ma altamente specifico della regione "Long Terminal Repeats" del genoma del virus:

*Sense (8989)5'*                    *TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG - 3'*  
*Antisense (176) 5'*                *CCACGTTGGGCGCCAGCTGCGAGA - 3'*

Al fine di marcare le sonde, la PCR era eseguita in presenza di un rapporto di concentrazione tra dTTP e DIG-16-dUTP di 3:1 (150 µM:50µM) come descritto da Dennis Lo et al. (1). Alla miscela di amplificazione, preparata seguendo i protocolli usuali, venivano aggiunti 5 µl di DNA target provirale. Le provettine contenenti la miscela completa venivano quindi sottoposte a 35 cicli di PCR, comprendenti una fase di denaturazione a 94°C per 60", una fase di annealing a 50°C per 60" ed una fase di allungamento o replicazione a 72°C per 2'.

Il successo della marcatura veniva controllato mediante elettroforesi in gel di agarosio di 4µl del prodotto di amplificazione. Questo veniva quindi blottato su membrana di nylon caricata positivamente con metodo di trasferimento alcalino (tampone NaOH 0,4M). Il DNA era fissato alla membrana incubandola per 30' a 120°C. La marcatura delle sonde veniva confermata incubando la membrana in presenza di un anticorpo monoclonale anti-digoxigenina (Boheringer Mannheim) coniugato con fosfatasi alcalina ed utilizzando NBT ed X-fosfato per la rilevazione della attività enzimatica. Le sonde erano purificate mediante cromatografia a scambio ionico (QIAGEN PCR purification spin Kit), concentrate con precipitazione in isopropanolo e risospese in 50µl di TE. Esse venivano infine denaturate a 95° C per 5' ed immediatamente raffreddate in bagno ghiacciato.

### **Ibridazione in situ**

Tutta la procedura veniva eseguita per capillarità con sistema Microprobe (Biomed) (2, 3, 4.). Le sezioni, rapidamente sparaffinate in xilolo e alcool assoluto, venivano reidratate e trattate con HCl 0,2 N x 15' (RT),

Triton X-100 0,3% x 15' (RT), Protease K (+2mM CaCl<sup>2</sup>) 10 mg/ml x 10' a 37°C, Tris-HCl 10mM pH 8,3 x 5' (2 volte) RT; i campioni venivano sottoposti quindi a post-fissazione in paraformaldeide 4% x 2' RT e trattamento con cocktail pre-ibridazione (2xSSPE/50% di formamide) 1h RT. La sonda marcata con digoxigenina veniva diluita 1:100 in buffer di ibridazione standard (Tris 1mM a pH 6,7, Denhardtts 1x, SSPE 2x, formamide 50%, SDS 0,5%, DNA di sperma di salmone 0,25 mg/ml) e il cocktail veniva quindi aspirato sui vetrini. A questo punto si effettuava la denaturazione termica previa incubazione a 100°C per 15' e quindi l'ibridazione (overnight a 37°C). I lavaggi venivano condotti come segue: SSPE 4X 5' RT; SSPE 2X 30'x 2 RT; SSPE 1X 10' RT; SSPE 1 X 30' 50°C; SSPE 1 X 20' RT. La reazione proseguiva quindi con un primo passaggio "blocker", eseguito mediante trattamento per 30' con una soluzione contenente 0,2 ml di Normal Rat Serum, 30 µl di Triton X-100 e Buffer 1 (Tris 0,1M a pH 7,6 + NaCl 0,15M - pH finale corretto a 7,5) portato a 10 ml totali; seguivano quindi: Buffer 1 x 5' RT, Antisiero anti-Digoxigenina coniugato con Fosfatasi alcalina x 2 h RT (composizione: 20 µl anti-DIG-AP Boehringer, 103 µl NRS, 31 µl Triton X-100, Buffer 1 portato a 10 ml), Buffer 1 x 15' (x 2) RT, Buffer 3 x 5' RT (Tris 0,1M a pH 9,5 + NaCl 0,1M + MgCl<sup>2</sup> 0,05M con pH finale corretto a 9,5). Veniva quindi eseguita, overnight a temperatura ambiente, la rivelazione dell'attività enzimatica (soluzione contenente 45 µl di cromogeno NBT, 35 µl di X-fosfato, 2,3 mg di Levamisolo, 10 ml di Buffer 3); i vetrini venivano infine lavati in acqua deionizzata, rimossi dal sistema per capillarità e montati in Crystal mount Biomeda.

Ad analogo trattamento venivano sottoposti anche campioni di polmone ovino negativi per MVV e campioni positivi che però, al momento dell'ibridazione, venivano trattati con cocktail privo di sonda o con sonda "irrilevante" (specifica per un segmento di 229 bp della sequenza IS900 di *Mycobacterium paratuberculosis*) (5).

### **Analisi d'immagine**

I vetrini venivano sottoposti ad un'analisi d'immagine semplificata: questa era realizzata sovrapponendo al monitor del videomicroscopio un reticolo a maglie regolari; in esso venivano individuati con metodo random alcuni riquadri di calcolo, al cui interno si procedeva alla conta dei segnali e al calcolo delle percentuali dei differenti citotipi positivi; i dati venivano infine sottoposti al test di confronto fra le medie.

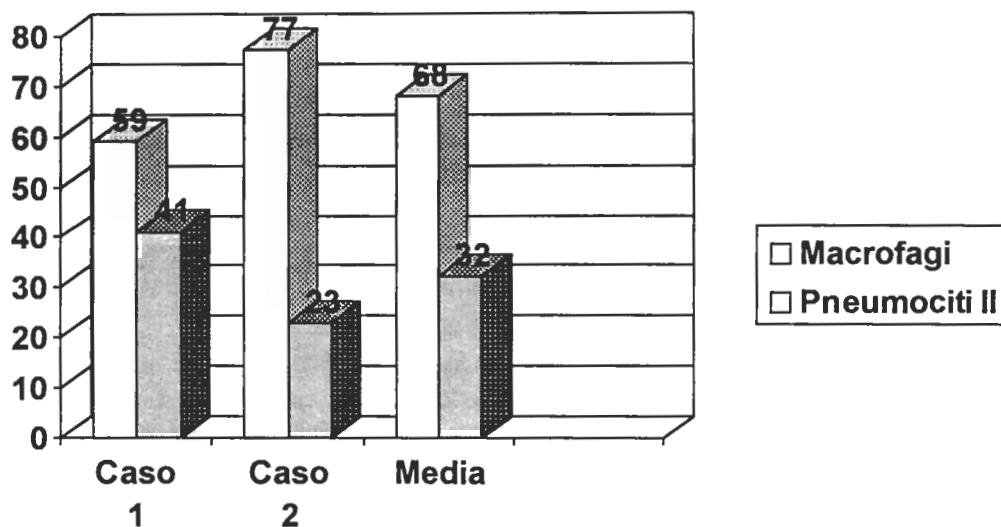
### **RISULTATI**

La produzione e la marcatura della sonda specifica per il segmento di 291 bp della regione LTR veniva confermata dal controllo elettroforetico, che sottolineava una ridotta mobilità del DNA marcato rispetto a quello non marcato.

Positivi riscontri provenivano anche dalle verifiche condotte in Southern blotting mediante sistema Anti-DIG-AP e rivelazione con NBT; in questo caso si osservavano bande distinte corrispondenti all'amplificato marcato con Digoxigenina.

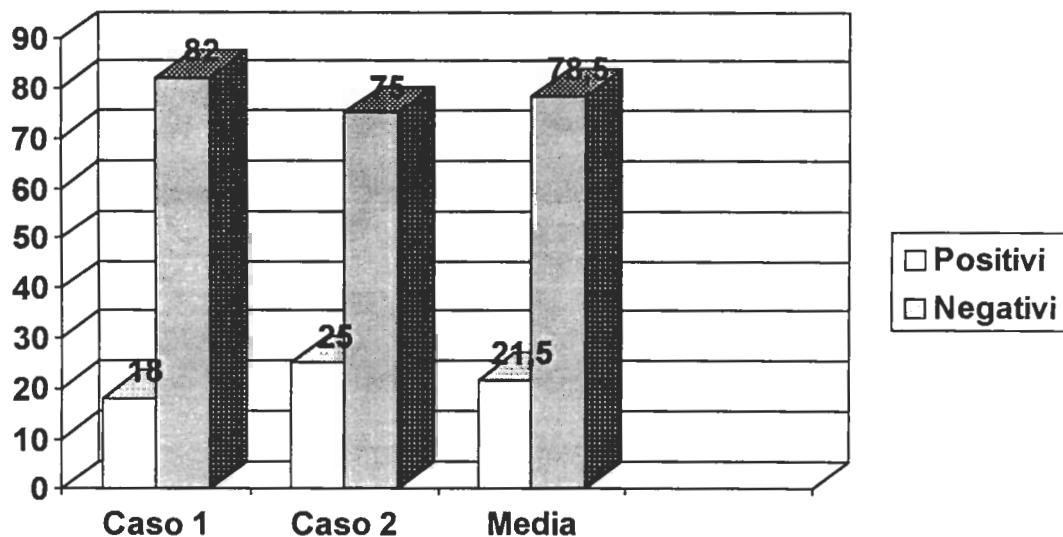
L'ibridazione in situ consentiva di rilevare segnali forti e regolari, in n° medio di  $13,5 \times 0,01\text{mm}^2$  nel 1° caso e di  $26,25 \times 0,01 \text{ mm}^2$  nel secondo; il confronto fra le medie rilevate su campi diversi dello stesso preparato, consentiva di stabilire che le differenze erano statisticamente non significative ( $p>0,5$ ); la significatività statistica risultava invece elevata per le differenze registrate fra i due diversi casi esaminati. Per quanto riguarda la localizzazione dei segnali, essi venivano osservati all'interno di macrofagi interstiziali (anche in noduli linfoidi), di pneumociti II e di epitelii bronchiali. Nella tabella n.1 vengono riportati i rapporti percentuali fra segnali ottenuti da macrofagi e da pneumociti. Nella tabella 2 è invece schematizzata la percentuale di positività/negatività negli epitelii bronchiali.

**Tab. n.1: DNA provirale in macrofagi e pneumociti II. Rapporti percentuali**



Riguardo alla percentuale di cellule positive, i dati apparivano piuttosto omogenei; l'attendibilità statistica di tali valori veniva confermata dai risultati del test di confronto fra le medie. Essi sono riportati nella tabella n.2.

**Tab. n.2: DNA provirale in epiteli bronchiali**



Nei pneumociti II e negli epiteli bronchiali i segnali risultavano prevalentemente localizzati nel nucleo, mentre nel caso dei macrofagi, essi

venivano reperiti alternativamente in sede nucleare e citoplasmatica. Questi ultimi erano presenti tanto nell'interstizio infiammato quanto all'interno delle caratteristiche formazioni nodulari linfoidi.

I preparati controllo risultavano invece costantemente negativi.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'esperienza da noi condotta in ordine alla produzione della sonda specifica per la regione LTR, conferma che essa, oltre ad essere di relativa semplicità di allestimento, è anche di soddisfacente riproducibilità.

Le prove di i.s.h. hanno consentito di rilevare forti segnali, oltre che nei macrofagi, anche all'interno dei pneumociti II e degli epitelii bronchiali (in cui il DNA provirale si è presentato spesso in sede endonucleare).

La presenza del DNA provirale in citotipi notevolmente differenti per specializzazione funzionale e addirittura per origine embriologica, farebbe supporre il possesso, da parte del virus, di un passe-partout molecolare in grado di garantire l'adesione e la penetrazione in cellule diverse; resta da chiarire il "minimo comun denominatore" che lega tutti i menzionati citotipi all'MVV.

Dal complesso dei dati emersi nel corso dello studio, scaturisce anche un'altra riflessione: l'integrazione nel genoma di cellule suscettibili di intraprendere attività mitotiche (macrofagi, epitelii e pneumociti II) potrebbe condurre a un aumento del contingente di DNA provirale. In altre parole, il virus perseguirebbe, attraverso la "pars" trascritta, una precisa strategia di amplificazione del suo contingente; quest'ultima costituirebbe un ulteriore importante elemento nella patogenesi dell'infezione, unitamente alla diversificazione genica attribuibile alla nota "infedeltà" della sua transcriptasi inversa ( $1/10^4$  di frequenza di errore vs.  $1/10^9$  delle polimerasi cellulari).

Da ultimo, assai interessante appare l'integrazione a livello bronchiale: essa garantirebbe, a ritrascrizione avvenuta, l'eliminazione dell'agente eziologico per via respiratoria. Oltre che come serbatoio per il mantenimento dell'infezione, il DNA provirale si comporterebbe dunque come riserva anche nei confronti della diffusione della malattia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dennis Lo Y.M. et al., in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, 113.
2. Brigati D.J et al., *Virology*, 1983,126, 32.
3. Montone K.T., *Yale Journ. Biol. and Med.*, 1989, 62, 141.
4. Sanna E. et al., *Proceedings of 12th Europ. Congr. of E.S.V.P.*, 1994, 88.
5. Pittau M., Sanna E. et al. *Proc. 13th Europ. Congr. of E.S.V.P.*, 1995 (in press).
6. Staskus K.A. et al., *Microbial Pathogenesis*, 1991, 11, 67.
7. Haase, A. T., *Nature*, 322, 130, 1986.
8. Haase, A. T., Analysis of viral infections by in situ hybridization, in *In situ Hybridization - Applications to Neurobiology, Symposium Monograph*, Valentino, K. L., Eberwine, J., H., and Barchas, J. D., Eds., Oxford University Press, New York, 1987, 197.
9. Scott J. et al., *Am. J. Path.*, 1995, 146, 1, 250.



Foto n. 1: controllo della produzione della sonda. A sinistra: elettroforesi su gel di agarosio; mobilità elettroforetica leggermente differente dell'amplificato marcato rispetto a quello non marcato. A destra southern blotting positivo per il prodotto marcato.

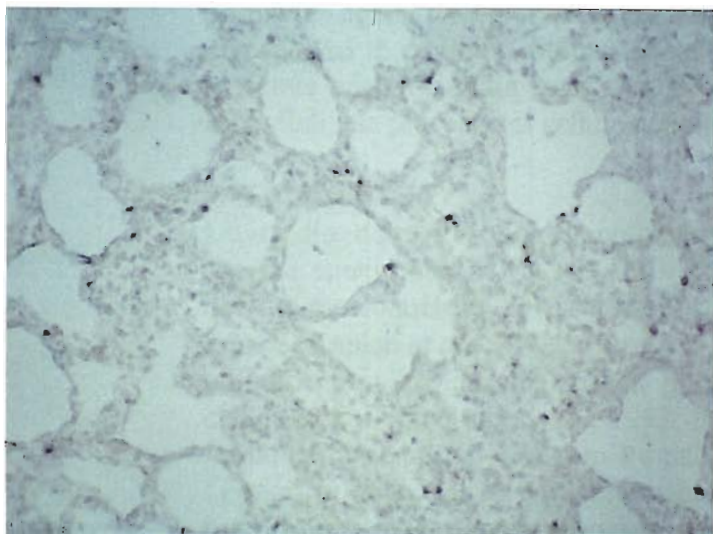


Foto n. 2: segnali di ibridazione nell'interstizio infiammato e a ridosso degli alveoli. NBT, piccolo ingrandimento.

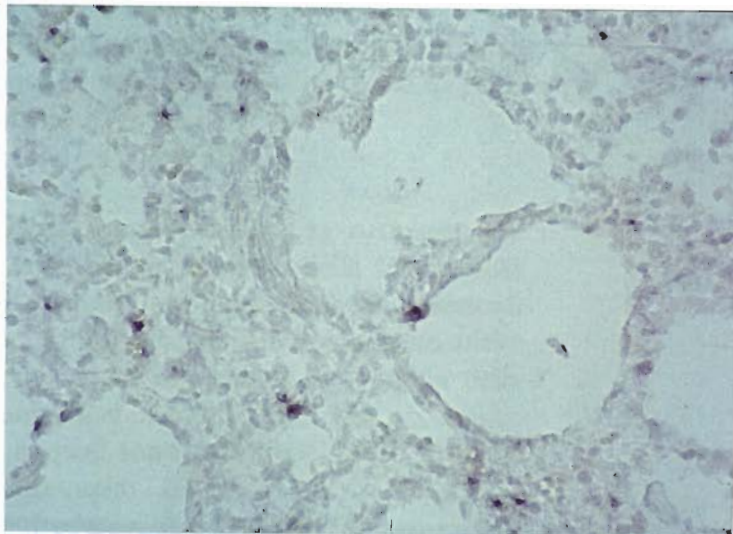


Foto n. 3: segnali in macrofagi interstiziali e in un pneumocito II al centro del campo. NBT, medio ingrandimento.

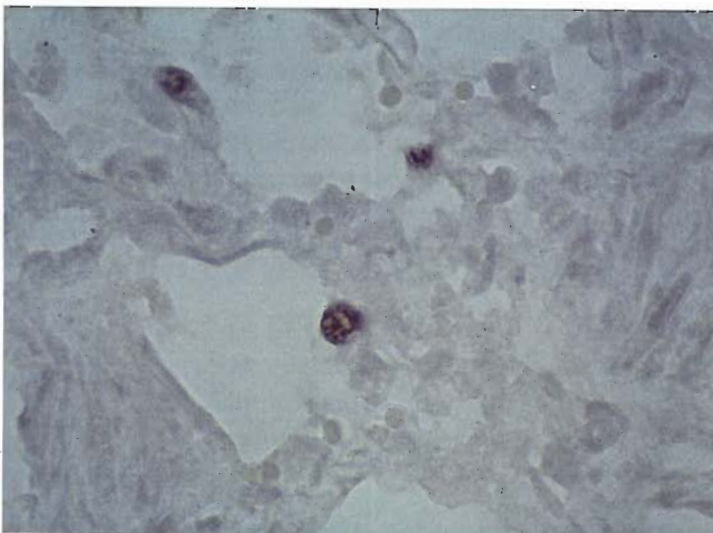


Foto n. 4: in evidenza il nucleo positivo di un pneumocito. NBT, medio ingrandimento.

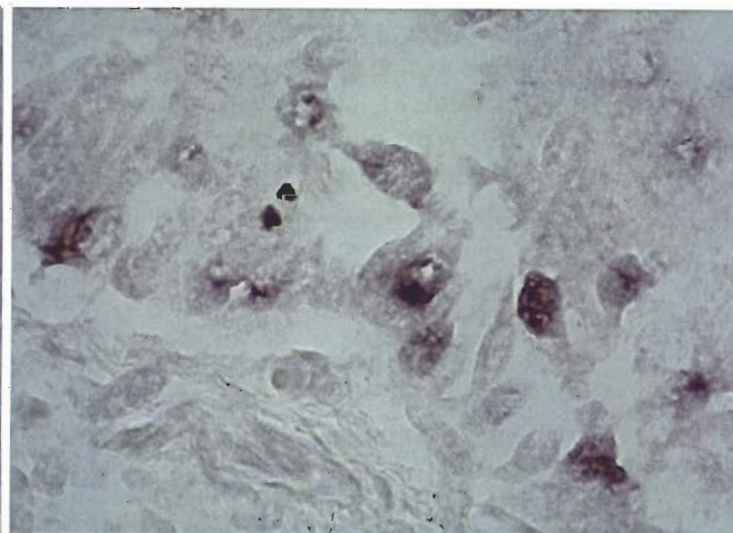


Foto n. 5: segnali di ibridazione all'interno di nuclei di cellule bronchiali. NBT, forte ingrandimento.

# INDAGINE PRELIMINARE SULL'ADERENZA DI GRANULOCITI NEUTROFILI DI CANE IN CORSO DI NEOPLASIE DEL SISTEMA EMATOPOIETICO

PALTRINIERI S., SARTORELLI P.

*Istituto di Patologia Generale Veterinaria, Milano.*

## RIASSUNTO

L'attività adesiva dei granulociti neutrofili (PMN) isolati da 2 cani colpiti da linfoma multicentrico e da 2 cani colpiti da leucemia mieloide acuta è stata valutata paragonandola a quella osservata in 10 cani sani. La popolazione cellulare isolata dai soggetti patologici mediante gradienti di densità in Percoll è risultata meno pura di quella dei soggetti di controllo. In particolare in corso di leucemia mieloide sono stati recuperati neutrofili a densità inferiore rispetto alla norma e cellule neoplastiche contaminanti. L'attività adesiva osservata nei diversi casi è risultata molto variabile: nella popolazione isolata in corso di leucemia mieloide acuta sono state rilevate anomalie funzionali almeno in parte ascrivibili alla presenza di cellule neoplastiche.

## INTRODUZIONE

Lo studio delle funzioni granulocitarie nei soggetti colpiti da neoplasie del sistema ematopoietico riveste notevole importanza: anomalie della funzionalità dei polimorfonucleati (PMN) sono state infatti rilevate in leucemie mieloidi umane (Kaplan *et al.*, 1992; Ohtsuki *et al.*, 1992); citochine di derivazione anche granulocitaria (es. interleukina 1), possono inoltre influenzare lo sviluppo delle cellule tumorali (Munker *et al.* 1993; Baumann *et al.*, 1992; Carter *et al.*, 1992). Infine nei linfomi non-Hodgkin's umani, ai quali sono assimilabili quelli del cane (Teske, 1994) sono particolarmente frequenti forme infettive da germi opportunisti, non sempre associate a neutropenia, forse ad indicare un difetto nelle funzionalità delle difese aspecifiche dell'organismo (Brown, 1984).

Tra i diversi processi che presiedono all'intervento difensivo dei PMN, l'aderenza assume particolare importanza ed è mediata da proteine di membrana tra le quali le integrine e le selectine (Gearing e Newman, 1993; MacKay e Imhof, 1993). L'aderenza leucocitaria può essere indagata indirettamente con metodi immunoistochimici o in citofluorimetria per evidenziare la presenza delle molecole di adesione o, secondo un approccio funzionale, valutando direttamente l'adesione delle cellule a substrati inerti o biologicamente attivi.

Nella presente nota si riferiscono dati preliminari sull'aderenza, valutata in micropiastre, di neutrofili isolati da sangue di cani affetti da linfoma e leucemia mieloide rispetto a soggetti di controllo.

## MATERIALE E METODI

Sono stati esaminati 2 cani colpiti da forme aleucemiche di linfoma, diagnosticate mediante biopsia per aspirazione con ago sottile ed esame citologico, 2 soggetti colpiti da leucemia mieloide acuta, diagnosticata mediante

esame emocromocitometrico e valutazione morfologica delle cellule tumorali, e 10 cani di controllo, senza sintomatologia clinica apparente.

Dai ogni animale sono stati prelevati 3 ml di sangue dalla vena cefalica dell'avambraccio prima di ogni eventuale trattamento. Dopo esame emocromocitometrico i leucociti sono stati isolati con Percoll utilizzando gradienti discontinui a due diverse densità (1,092 e 1,071) al di sopra dei quali è stato stratificato il sangue (Zwahlen *et al.*, 1994). Dopo centrifugazione le bande ottenute sono state sottoposte a lisi ipotonica e successivi lavaggi. Al termine le cellule isolate sono state diluite a  $2 \times 10^6$  cell/ml in Hanks e albumina 0,2%; la vitalità cellulare è stata valutata con il metodo di esclusione del Trypan blu ed il grado di purezza su citocentrifugati colorati con May Grünwald-Giemsa.

Per l'esecuzione delle prove di aderenza sono state utilizzate micropiastre a 96 pozzetti (Bellavite *et al.*, 1992) una parte dei quali preincubati con gelatina per valutare l'aderenza basale: negli altri pozzetti questa procedura è stata omessa per valutare l'attivazione aspecifica dei PMN al contatto con la plastica. In ogni pozzetto sono state poste  $2 \times 10^5$  cellule totali e, dopo incubazione ed eliminazione mediante lavaggi delle cellule non aderenti, le cellule adese sono state lisate; è stata quindi valutata colorimetricamente la attività della fosfatasi acida, proporzionale al numero delle cellule adese.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Da un punto di vista ematologico (tabella 1) tutti i soggetti patologici mostravano un certo grado di anemia e di leucocitosi neutrofila, più evidenti negli animali leucemici, nei quali peraltro la maggior parte degli elementi mieloidi si presentava a stadi precoci di maturazione ed erano evidenziabili elementi indifferenziati.

Gr.	cani	Eritrociti	Hb	Ht	Leucociti	Neutrofilii	Eosinofili	Basofili	Linfociti	Monociti	Cellule
N°	N°	(n/mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(%)	(n/mm <sup>3</sup> )	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	anomale (%)
1	1	4903300	12,3	35	19719	82	1	0	15	2	0
	2	3677850	8,3	23	31398	91	0	0	4	5	0
2	3	1685000	4	14	89650	68	0	0	11	5	16
	4	2170800	5,1	15	78924	63	0	0	12	11	14

Tabella 1: valori relativi ai parametri ematologici rilevati negli animali colpiti da linfoma (Gr.1) e da leucemia mieloide (Gr.2)

Come già riscontrato in precedenti lavori svolti presso il nostro Istituto (Lupo, 1994) in corso di neoplasia il grado di purezza dei PMN dopo isolamento con Percoll è molto più variabile che nei controlli (tabella 2).

I PMN degli animali colpiti da linfoma hanno mostrato una notevole variabilità individuale nelle capacità adesive con una scarsa risposta all'attivazione aspecifica (tabella 2). In entrambi i casi era presente un'intensa neutrofilia. Nel soggetto n° 1 si riscontra un'elevata aderenza basale, con un quadro funzionale simile a quello da noi osservato in animali con neutrofilie da flogosi purulente, pur non presentando il soggetto in esame segni evidenti di infezione. Nel cane n°2 l'elevata neutrofilia appare almeno in parte imputabile alla ridottissima attività adesiva dei PMN, con liberazione del *pool* marginale, in analogia con quanto segnalato in condizioni di ridotta funzionalità granulocitaria quali la

*leukocyte adhesion deficiency* (LAD), patologia ereditaria segnalata anche nel cane (Giger, 1995). Un ampliamento della casistica si rende necessario per valutare quanto questi quadri siano ripetibili e correlabili alla presenza di un linfoma.

Gr. N°	cane N°	Neutrofili (%)	Cellule anomale (%)	Vitalità (%)	Recupero PMN (%)	aderenza basale (D.O.)	Aderenza attivata (D.O.)	% attivazione
1	1	95	0	97	11,6	0,741	0,808	+ 9%
	2	84	0	98	38,5	0,021	0,026	+ 24%
2	3a	73	18	97	26,4	0,455	0,938	+ 106%
	3b	46	38	97	2,1	0,045	0,061	+ 36%
	4a	98,5	0,5	99	54,1	0,239	0,248	+ 4%
	4b	53	21	98	17,1	0,164	0,273	+ 66%
Controlli		96,9 ± 1,9	//	97,1 ± 1,5	23,6 ± 9	0,228 ± 0,103	0,338 ± 0,120	+ 48%

Tabella 2: valori relativi alle popolazioni isolate con Percoll ed all'aderenza osservata negli animali colpiti da linfoma (Gr. 1) e da leucemia mieloide (Gr.2) e valori medi osservati nei soggetti di controllo: nel gruppo 2 sono riportati i valori ottenuti nelle bande a densità superiore (3a, 4a) e inferiore (3b, 4b)

Anche nei due casi di leucemia mieloide esaminati il comportamento dei PMN è risultato differente (tabella 2). I PMN compaiono in discreta percentuale anche nella banda a densità inferiore, solitamente ricca di linfociti; questo conferma la presenza di sottopopolazioni di PMN a densità diversa dalla norma già segnalate in corso di neoplasie mieloidi (Thomsen *et al.*, 1991). Gli elementi immaturi si distribuiscono in entrambe le bande, soprattutto in quella a densità inferiore. Nel cane n° 3 l'aderenza basale delle cellule a maggiore densità (3a) è risultata superiore a quella degli animali di controllo, con intensa risposta alla stimolazione aspecifica; Le cellule a minore densità (3b) hanno invece evidenziato un'aderenza basale notevolmente ridotta, non interamente giustificabile con il minor numero di cellule presenti: il bassissimo recupero osservato in quest'ultima banda potrebbe indicare l'esistenza di una sottopopolazione di PMN anomala anche da un punto di vista funzionale. Nel cane n°4 entrambe le popolazioni cellulari isolate mostrano un'aderenza basale sovrapponibile a quella dei controlli, tenuto conto del diverso numero di cellule presenti (98,5% e 53%): le due popolazioni differiscono tuttavia per la risposta alla stimolazione aspecifica, praticamente assente nelle cellule a densità superiore e più marcata in quelle a densità inferiore. In entrambi i soggetti esaminati queste alterazioni potrebbero dipendere, oltre che da difetti intrinseci dei fagociti, anche dalla interferenza delle cellule neoplastiche e/o degli altri elementi cellulari, presenti, seppure in percentuali diverse, nelle popolazioni isolate.

In conclusione sono state rilevate anomalie fisico-chimiche e funzionali nei PMN isolati dai soggetti patologici, con spiccate differenze non solo tra animali affetti dallo stesso tipo di neoplasia, ma anche tra popolazioni cellulari isolate dallo stesso soggetto. Ciò conferma l'estrema variabilità riscontrabile nei tumori. Nei diversi casi variano la densità dei PMN e di eventuali cellule tumorali e, di conseguenza, la popolazione cellulare isolata. E' possibile che le alterazioni osservate siano almeno in parte secondarie all'influenza di altri tipi cellulari o che siano imputabili alla presenza di elementi immaturi e/o neoplastici: va tuttavia considerata anche la possibilità che questi elementi, o gli stessi PMN immessi in circolo in condizioni di neoplasia presentino un anomalo contenuto in fosfatasi acida. Alterazioni del corredo enzimatico dei PMN sono state segnalate in corso

di leucemie mieloidi croniche nell'uomo, per quanto riguarda mieloperossidasi elastasi e lattoferrina (Davey *et al.* 1988) e nel cane per quanto riguarda perossidasi e  $\alpha$ -naftil-acetato esterasi (Madewell *et al.* 1991).

**SUMMARY** - Adhesive properties of neutrophils (PMN) isolated from 2 dogs with multicentric lymphoma and from 2 dogs with acute myeloid leukaemia were investigated and compared with the results obtained from 10 healthy dogs. The Percoll density gradient sedimentation showed a cell population less pure in pathologic than in control dogs. Hypodense PMNs as well as neoplastic cells were isolated in leukaemic dogs. Adhesive ability showed marked individual differences: PMNs isolated from leukaemic dogs showed functional abnormalities maybe due to the contaminating neoplastic cells.

**BIBLIOGRAFIA** - Baumann M.A. *et al.* (1992) *Am. J. Hematol.* 39:269-274 - Bellavite P. *et al.* (1992) *J. Leukocyte Biol.*, 51:392-335 - Brown A.E. (1984) *Am. J. Med.* 76:421 - Carter A. *et al.* (1992) *Am. J. Haematol.* 40:245 - Davey F. R. *et al.* (1988) *Hum. Pathol.* 19:454-459 - Gearing A.J.H., Newman W. (1993) *Immunol. Today*, 14:506-512 - Giger U. (1995) Atti 28° incontro di aggiornamento permanente SCIVAC, Riccione 1995 - Kaplan S.S. *et al.* (1992) *Acta Haematol.* 87:16-21 - Lupo F. (1994) Valutazione di differenti metodiche per l'isolamento dei granulociti neutrofilo da sangue di cane: Tesi di Laurea in Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, A.A. 1993-94 - Madewell B.R. *et al.* (1991) *Comp. Haematol. Int.* 1:117-120 - Mackay C.R. and Imhof B.A. (1993) *Immunol. Today*, 14:99-102 - Munker R. *et al.* (1993) *Acta Haematol.* 90:77-83 - Ohtsuki T. *et al.* (1992) *Am. J. Hematol.* 41:50-56 - Teske E. (1994) *Vet. Quarterly* 4:209-219 - Thomsen M.K. *et al.* (1991) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28:143-156 - Zwahlen R.D. *et al.*: *Vet. Pathol.* (1994), 31:61-66

# CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO ISTOLESIVO ED IMMUNOLOCALIZZAZIONE DELLA PrP<sub>Sc</sub> IN CASI NATURALI DI SCRAPIE OVINA.

**AGRIMI U.\*, DI GUARDO G.°, ELENI C.°, MARCON S.\*,  
DI BARI M.A.\*, LIGIOS C.#, FAZZI P.\*, CARDONE F.\*\*,  
POCCHIARI M.\*\*.**

*Istituto Superiore di Sanità, (\*) Laboratorio di Medicina Veterinaria e  
(\*\*) Laboratorio di Virologia, viale Regina Elena 299 - 00161 ROMA.  
(°) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, via  
Appia Nuova 1411 - 00178 ROMA.  
(#) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff", via  
Duca degli Abruzzi 8 - 07100 SASSARI.*

## **RIASSUNTO**

Gli Autori descrivono i quadri istopatologici e l'immunolocalizzazione della GFAP e della PrP<sub>Sc</sub> in 25 aree del SNC di 8 ovini con scrapie naturale, provenienti da due allevamenti della Sardegna.

Il profilo lesivo appariva sostanzialmente omogeneo fra i due gruppi di animali. In proposito, reperti di marcata spongiosi erano evidenti soprattutto a carico delle porzioni sottocorticali del telencefalo (setto, nucleo caudato) e del diencefalo (talamo, ipotalamo, corpi mammillari), mentre la vacuolizzazione neuronale era localizzata pressochè esclusivamente nei nuclei del mesencefalo e del midollo allungato.

L'astrocitosi, presente in tutti i casi esaminati, si apprezzava particolarmente a livello di setto, talamo, mesencefalo e midollo spinale.

Immunoistochimicamente, la presenza di PrP<sub>Sc</sub>, sotto forma di fini granulazioni o di inclusioni tondeggianti in sede citoplasmatica, risultava evidente soprattutto a carico dei neuroni di mesencefalo, ponte e midollo allungato. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> erano pure localizzati tra i fasci di fibre della sostanza bianca del tronco encefalico. Nelle stesse sedi anatomiche si osservavano elementi cellulari, GFAP-negativi, all'interno dei quali era presente un piccolo nucleo centrale ipercromatico da cui si dipartivano processi, PrP<sub>Sc</sub>-positivi, disposti a raggiera. Positività citoplasmatica era apprezzabile anche a livello di alcuni astrociti. Depositi marcati di PrP<sub>Sc</sub> erano presenti attorno ai vasi, specialmente quelli della sostanza bianca, nonchè in sede subependimale e subpiaie.

Il quadro clinico e lesivo sostanzialmente omogeneo portano a supporre una identità del ceppo, o dei ceppi coinvolti nei due focolai di malattia.

**Parole chiave:** scrapie, ovino, PrP<sub>Sc</sub>, immunoistochimica.

## **INTRODUZIONE**

La scrapie della pecora e della capra appartiene al gruppo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) o malattie da prioni (1). Queste sono causate da agenti la cui natura non è stata ancora definitivamente chiarita e sono caratterizzate dall'accumulo, in sede cerebrale, della isoforma alterata, denominata PrP<sub>Sc</sub> (da "scrapie"), di una sialoglicoproteina cellulare indicata come PrP<sub>C</sub> (da "cellulare") (1).

Tra le EST, la scrapie rappresenta la patologia più studiata sia in condizioni sperimentali che naturali. Le ricerche su questa malattia hanno contribuito in maniera determinante alla comprensione della patogenesi, dell'epidemiologia e dei meccanismi di trasmissione di questo gruppo di malattie ed hanno condotto, più di 30 anni fa, alla fondamentale scoperta dell'esistenza di differenti ceppi di agente della scrapie (2). Da allora sono stati identificati, in base alle caratteristiche cliniche e patologiche della malattia trasmessa su linee murine inbred, circa 20 diversi ceppi (3). I risultati di tali ricerche, difficilmente spiegabili senza ipotizzare il possesso, da parte dell'agente, di un acido nucleico, hanno avuto importanti implicazioni negli studi di eziopatogenesi delle EST e rappresentano uno dei maggiori ostacoli interpretativi della teoria prionica, che sostiene la natura esclusivamente proteica dell'agente delle EST (4).

Lo studio dei ceppi negli animali da laboratorio ha però portato a trascurare le indagini sul significato biologico della loro esistenza e sulle possibili implicazioni di questi nell'epidemiologia e nella patogenesi dell'infezione naturale. Sebbene non siano mai stati condotti studi specifici in tal senso, è facile però ipotizzare che le differenti manifestazioni cliniche e patologiche segnalate nei diversi focolai di scrapie naturale non siano occasionali ma legate al particolare ceppo di scrapie in causa ed alle caratteristiche della popolazione ovina ospite (5). Anche lo studio del quadro lesivo cerebrale si è sempre limitato alla descrizione di singoli casi di malattia e non sono mai stati condotti studi comparativi su soggetti provenienti da differenti focolai di infezione. Tali carenze derivano in gran parte dalle numerose ed imprevedibili variabili relative sia all'ospite che al ceppo di agente in causa, le quali rendono complessi l'interpretazione e il confronto dei quadri clinici e lesivi osservati in casi di scrapie naturale (6). Ciononostante, l'identificazione dei ceppi coinvolti in focolai naturali di malattia rappresenta un aspetto di indiscutibile interesse. Pertanto, nel tentativo di colmare le lacune conoscitive relative alle caratteristiche della malattia e dei ceppi responsabili dell'infezione nel nostro Paese, abbiamo ritenuto utile avviare, parallelamente alla trasmissione e caratterizzazione di ceppi su topi da laboratorio, lo studio della malattia anche nell'ospite naturale.

Nel presente lavoro vengono descritti e discussi i reperti istopatologici ed immunoistochimici osservati, in sede cerebrale, in alcuni casi naturali di scrapie ovina.

## **MATERIALI E METODI**

Gli 8 animali oggetto del presente studio provenivano da due allevamenti situati nel nord della Sardegna (7). Sette soggetti, d'età compresa tra i 22 e i 36 mesi, erano originari del primo allevamento, mentre l'ottavo animale, di 24 mesi d'età, proveniva dalla seconda azienda.

Tutti gli animali, nello stadio terminale della malattia, sono stati sacrificati e sottoposti ad autopsia nel corso della quale si è proceduto al prelievo ed alla fissazione in formalina neutra al 10% dell'encefalo. In 4 casi quest'ultimo è stato fissato *in toto*, nei rimanenti 4 la fissazione ha interessato la porzione maggiore dell'organo risultante da un taglio operato lungo la linea sagittale paramediana a partire dai lobi frontali fino al midollo allungato. La rimanente porzione di tessuto cerebrale è stata congelata subito dopo il prelievo e successivamente impiegata per la conferma diagnostica mediante western-blot. Da 5 soggetti è stato inoltre prelevato e fissato in formalina il segmento C1-C2 del midollo spinale.

Porzioni coronali interessanti i vari distretti del sistema nervoso centrale (SNC) sono state incluse in paraffina, sezionate ad uno spessore di 7  $\mu$  e colorate con ematossilina-eosina, con una metodica combinata luxol fast blue-cresyl violetto e con tecniche immunoistochimiche biotina-streptavidina-perossidasi per la dimostrazione della proteina acida gliofibrillare (GFAP) e della PrP<sub>Sc</sub>. Ai fini della immunolocalizzazione rispettivamente della GFAP e della PrP<sub>Sc</sub>, le sezioni sono state sottoposte ad un pretrattamento con pronase XIV (Sigma) allo 0,5% per 7 min a 37°C, ovvero immerse in acqua distillata ed autoclavate a 121°C per 30 min (8).

Per lo studio del profilo lesivo ci siamo riferiti, nella scelta delle aree cerebrali da esaminare, a quanto pubblicato sulla scrapie della capra (9) e sulla chronic wasting disease dei cervidi (10). In base all'entità del quadro lesivo, è stato attribuito ad ogni area un punteggio da 0 a 5, secondo i criteri utilizzati per la caratterizzazione del profilo lesivo sul topo (11).

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati derivanti dallo studio di 25 aree rappresentative del SNC.

## RISULTATI

I risultati relativi ai quadri istopatologici osservati nei casi di scrapie oggetto del presente lavoro sono riportati nei grafici 1, 2 e 3.

Il profilo lesivo, relativamente alla spongiosi ed alla vacuolizzazione neuronale, appariva omogeneo. La prima interessava soprattutto le porzioni sottocorticali del telencefalo (setto, nucleo caudato) ed il diencefalo (talamo, ipotalamo, corpi mammillari), la seconda era localizzata pressochè esclusivamente nei nuclei del mesencefalo e del midollo allungato.

Sebbene con variazioni individuali maggiori rispetto alla vacuolizzazione, in tutti i casi esaminati era presente astrocitosi, senza che peraltro si potesse apprezzare con chiarezza una correlazione tra i due diversi aspetti lesivi.

Immunoistochimicamente, la presenza di PrP<sub>Sc</sub> risultava evidente soprattutto a livello di mesencefalo, ponte e midollo allungato. In tali sedi la positività immunoistochimica si presentava sotto forma di fini granulazioni o, più raramente, di singole o multiple inclusioni tondeggianti, occupanti il citoplasma dei neuroni. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> particolarmente marcati erano presenti tra i fasci di fibre della sostanza bianca del tronco encefalico. Alcuni assoni apparivano talvolta positivi per gran parte della loro lunghezza. Sempre nelle stesse sedi anatomiche erano poi osservabili elementi cellulari, GFAP-negativi, caratterizzati dalla presenza di un piccolo nucleo centrale ipercromatico dal quale si

dipartivano processi, PrP<sub>Sc</sub>-positivi, disposti a raggiera. Positività citoplasmatica era apprezzabile anche a livello di alcuni astrociti. Depositi marcati di PrP<sub>Sc</sub> erano presenti, pressochè in tutte le aree considerate, attorno ai vasi, e specialmente a quelli della sostanza bianca. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> erano infine osservabili in sede subependimale ed, in minor misura, subpiaie.

## DISCUSSIONE

Nei casi di scrapie oggetto del presente studio, la vacuolizzazione dei neuroni del tronco encefalico, universalmente considerata l'aspetto lesivo più caratteristico della malattia (6,12), era accompagnata, nei distretti anteriori dell'encefalo, da una marcata spongiosi del neuropilo. Questa, secondo Fraser, risulterebbe poco evidente nella scrapie ovina naturale e particolarmente intensa, invece, in quella sperimentale (6). Nonostante ciò, la spongiosi, nei nostri casi, osservata a livello di aree generalmente poco colpite e scarsamente considerate ai fini diagnostici, come quelle diencefaliche e sottocorticali del telencefalo, costituiva l'alterazione neuropatologica di maggiore entità. In particolare, il *nucleus accumbens septi* risultava, nella totalità dei soggetti esaminati, il distretto cerebrale più gravemente leso.

Limitatamente alle aree appena indicate, la gravità e la distribuzione della spongiosi apparivano simili a quelle descritte nella scrapie della capra (9,13).

In pecore di razza Suffolk, Hadlow et al. (12), analogamente a quanto osservato nei casi da noi studiati, hanno descritto una marcata spongiosi a livello talamico, riportando però, tra le aree più colpite, anche la corteccia cerebellare, mantenuta sostanzialmente integra nei nostri casi.

Per quanto riguarda il nostro Paese, nei casi descritti da Cravero et al. (14), le differenze più significative consistevano nella costante assenza di lesioni a livello dei gangli della base e nel raro coinvolgimento dei nuclei talamici e del corpo mammillare. Ulteriori differenze riguardavano l'interessamento, sia pur infrequente, della corteccia cerebellare e, inversamente rispetto a quanto osservato da noi, il maggior coinvolgimento delle corna ventrali del midollo spinale rispetto alle dorsali.

Le alterazioni neuropatologiche, come costantemente riportato nei casi di scrapie naturale (6), presentavano, anche negli animali oggetto del presente lavoro, una distribuzione simmetrica.

Riguardo alla localizzazione immunoistochimica della PrP<sub>Sc</sub>, appare interessante osservare come questa fosse apprezzabile soprattutto nei distretti posteriori del tronco encefalico. Particolarmente diffusa e marcata era la localizzazione della proteina nelle aree di sostanza bianca. La PrP<sub>Sc</sub>, inoltre, pur essendo sempre presente nelle aree colpite da spongiosi, era evidenziabile anche in sedi apparentemente indenni. A tale proposito, occorre sottolineare che a livello di corteccia, distretto cerebrale pressochè risparmiato dalla spongiosi, gli unici accumuli significativi di PrP<sub>Sc</sub> si osservavano attorno ai vasi e, quasi esclusivamente, attorno a quelli della sostanza bianca. L'osservazione della presenza di PrP<sub>Sc</sub> in aree apparentemente non interessate da processi lesivi, la frequente localizzazione della proteina in sede perivasale e subependimale ed i marcati depositi di questa osservabili nella sostanza bianca, consentono di

ipotizzare, oltre ad una localizzazione intracerebrale dell'agente a seguito di diffusione ematogena, che la PrP<sub>Sc</sub>, una volta prodotta dalle cellule nervose, possa essere trasportata, attraverso meccanismi sconosciuti, in aree encefaliche diverse rispetto a quelle della sua sintesi. Occorre comunque considerare che, nella sostanza bianca e nelle aree perivasali e subependimali, era apprezzabile, contestualmente a quella per la PrP<sub>Sc</sub>, una forte positività immunostochimica nei confronti della GFAP. Questo porta a considerare con attenzione anche l'eventualità di un legame patogenetico tra astrociti e PrP<sub>Sc</sub>. D'altra parte, la sintesi di PrP<sub>C</sub> e del suo RNAm, nonché l'accumulo della isoforma patologica all'interno degli astrociti, sono tutti eventi patogenetici documentati in corso di scrapie (15); al riguardo, anche nei casi da noi studiati la positività immunostochimica delle differenti cellule nervose nei confronti della PrP<sub>Sc</sub> non si limitava ai soli neuroni. Ulteriori studi volti ad indagare il ruolo delle diverse popolazioni cellulari del SNC nella sintesi e "processazione" della PrP<sub>Sc</sub> nonché a chiarire i meccanismi della diffusione ed eventualmente del trasporto della PrP<sub>Sc</sub> nel SNC, contribuirebbero a svelare importanti aspetti ancora oscuri della patogenesi di tali infezioni.

Riteniamo che lo studio del quadro lesivo in casi di scrapie naturale possa fornire interessanti indicazioni, a condizione, ovviamente, di essere in possesso di sufficienti dati anamnestici sull'ospite. Gli 8 casi da noi studiati, tutti insorti in pecore di razza particolarmente selezionata, come quella sarda, e provenienti da due allevamenti situati a poche decine di chilometri l'uno dall'altro, mostravano un quadro clinico e lesivo sostanzialmente omogeneo, analogamente a quanto si verifica nella scrapie sperimentale indotta su topi inbred con ceppi clonati di agente. Tale osservazione consentirebbe di ipotizzare una identità del ceppo, o dei ceppi di agente coinvolti nei due focolai di malattia, così come della via di infezione, elemento anch'esso condizionante, come dimostrato su modelli murini, le caratteristiche del profilo lesivo (6).

Tra i dati anamnestici relativi all'ospite, riteniamo infine essenziale acquisire informazioni sulle caratteristiche genetiche dei soggetti colpiti. E' noto infatti che nella pecora, a livello del gene che codifica per la PrP<sub>C</sub>, esistono alcuni polimorfismi in grado di condizionare la comparsa e il fenotipo della malattia (16).

Alla luce dell'importanza che ha assunto di recente tale gruppo di malattie, unitamente alla necessità che all'obbligo di denuncia attualmente prescritto dal vigente Regolamento di Polizia Veterinaria, facciano seguito interventi gestionali corretti, riteniamo che la forte carenza di dati sulla scrapie nel nostro Paese necessiti di essere colmata. In particolare, accanto alle informazioni di carattere epidemiologico, occorrono studi più approfonditi sulla patologia e sulla patogenesi della malattia naturale nonché sulle caratteristiche dei ceppi responsabili dell'infezione, da un lato, e sul genotipo dell'ospite naturale, dall'altro.

## CHARACTERIZATION OF THE HISTOPATHOLOGICAL PROFILE AND PrP<sup>Sc</sup> IMMUNOLocalIZATION IN NATURALLY OCCURRING CASES OF SCRAPIE IN SHEEP.

### Summary

The Authors describe the histomorphological pattern and GFAP- and PrP<sup>Sc</sup> immunolocalization in 25 CNS areas of 8 sheep with natural scrapie, which were originary from two herds in Northern Sardinia.

The histopathological pattern was very similar between the two animal groups. A marked spongiosis was found in subcortical areas (septum, nucleus caudatus) and in the diencephalon (thalamus, hypothalamus, mammillary bodies), while neuronal vacuolation was evident in the mesencephalon and medulla oblongata nuclei.

Astrocytosis was observed in all cases, particularly in the septum, thalamus, mesencephalon and medulla oblongata.

Immunohistochemically, PrP<sup>Sc</sup>, was detected both as cytoplasmatic fine granulations and as roundish inclusions, in the mesencephalon, pons and medulla oblongata neurons. PrP<sup>Sc</sup> was also immunolocalized among bundles of white matter fibers, in the brain stem. Unidentified, GFAP-negative cells, with a small central hyperchromatic nucleus, surrounded by PrP<sup>Sc</sup>-positive radiating branches, were observed in the same anatomic locations. A marked PrP<sup>Sc</sup>-immunoreactivity was also detected around blood vessels, with special reference to those of the white matter, as well as of subependimal and subpial districts.

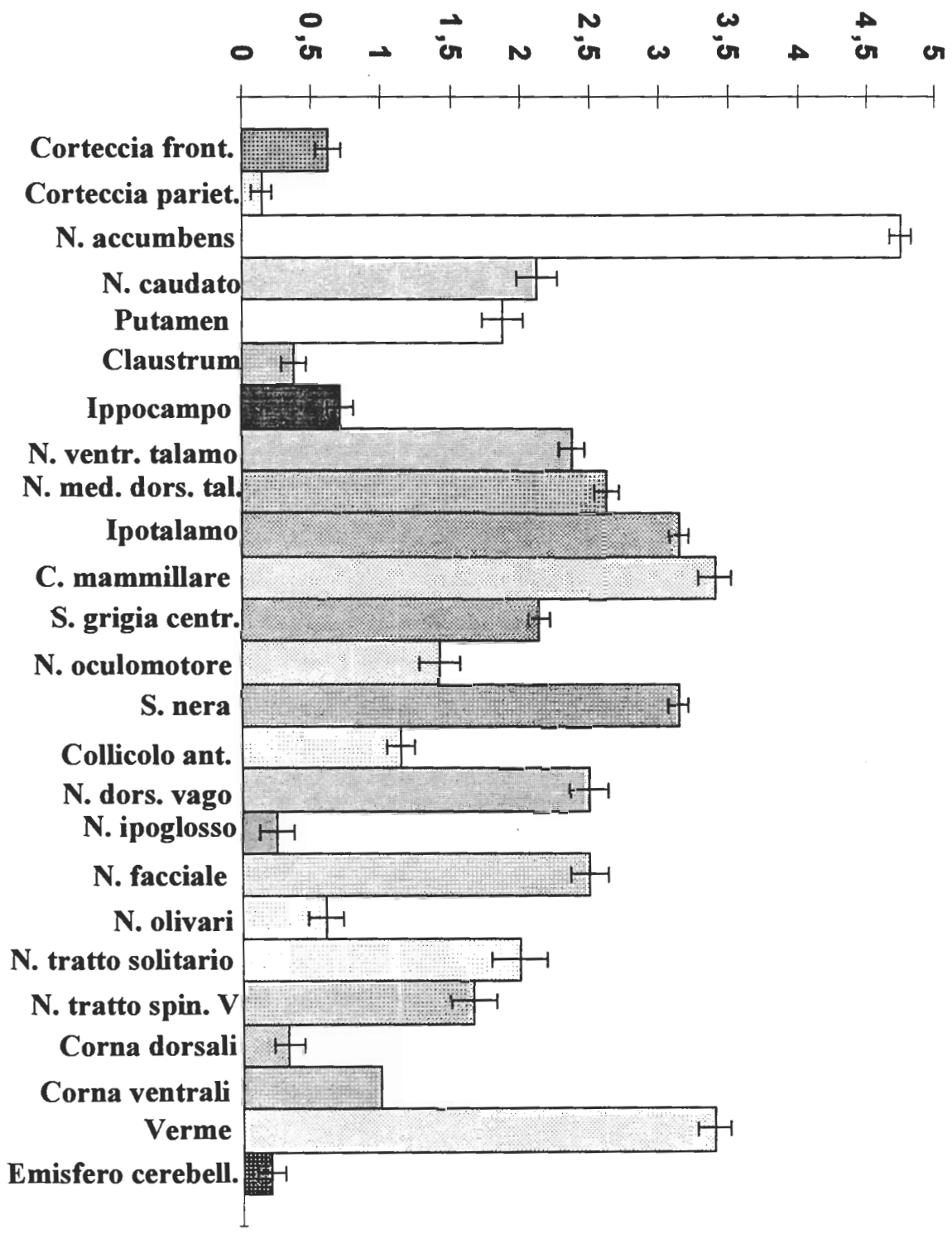
In conclusion, the clinical and pathological findings let us hypothesize the existence of one or more identical scrapie strains responsible for the two disease outbreaks.

**Key words:** scrapie, sheep, PrP<sup>Sc</sup>, immunohistochemistry.

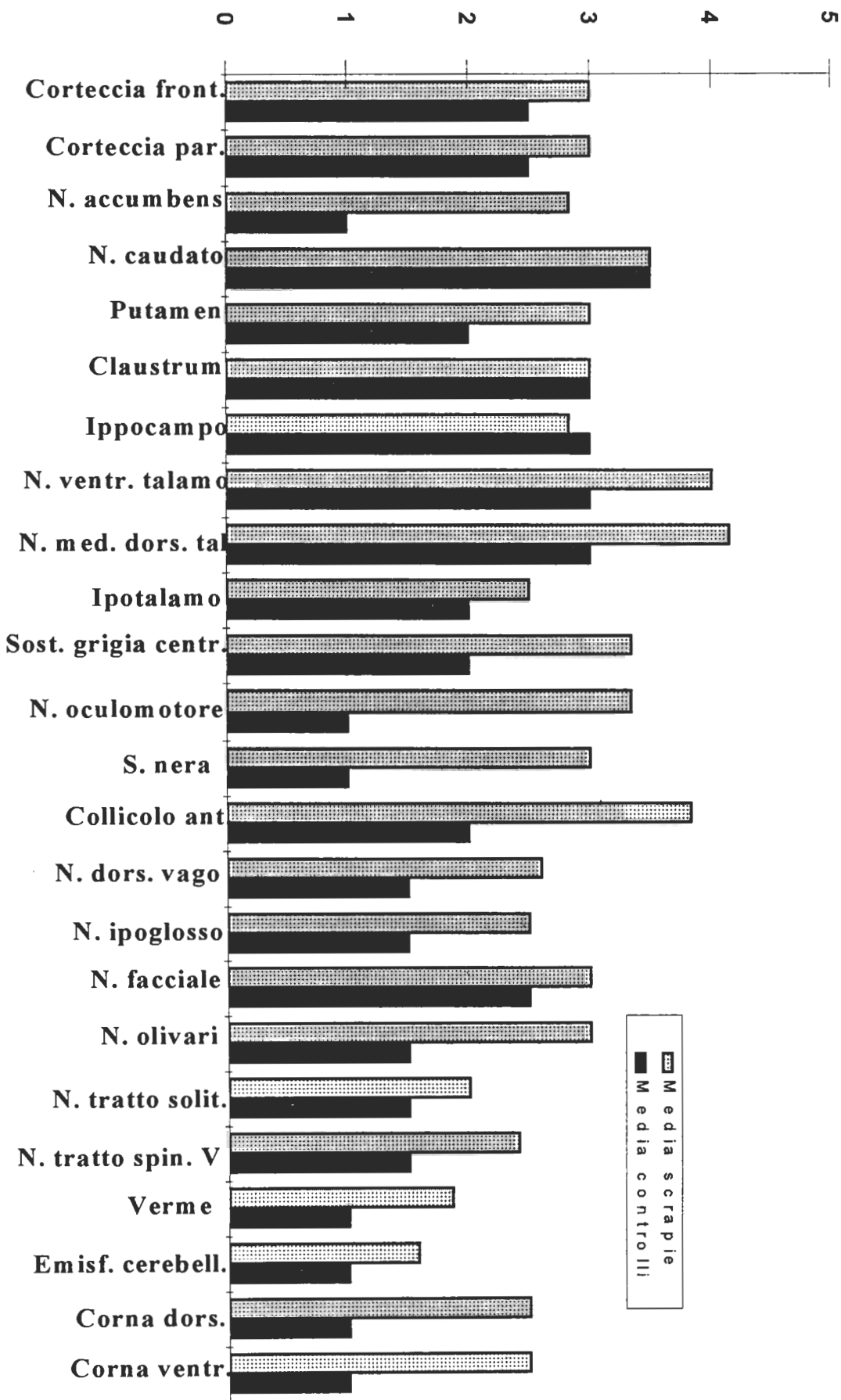
### BIBLIOGRAFIA

1. Pocchiari M. (1994). Prions and related neurological diseases. *Molec. Aspects. Med.* 15:195-291.
2. Pattison I.H., Millson G.C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Pathol.* 71:101-108.
3. Bruce M.E., Fraser H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172:125-138.
4. Prusiner S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
5. Detwiler L.A. (1992). Scrapie. In: Transmissible spongiform encephalopathies of animals. Rev. Sci. Tech. Office International des Epizooties vol. 11 pp. 491-537.
6. Fraser H. (1976). The pathology of natural and experimental scrapie. In Slow Virus Diseases of Animals and Man (R.H. Kimberlin, ed.). North-Holland, Amsterdam, 267-305.
7. Ligios C., Depalmas S., Agrimi U., Di Guardo G., Eleni C., Bitti G., Cardone F., Pocchiari M. Prima segnalazione di scrapie in Sardegna: rilievi clinici, epidemiologici e patologici. Atti Fe. Me. S. P. Rum. (1996) (in corso di stampa).

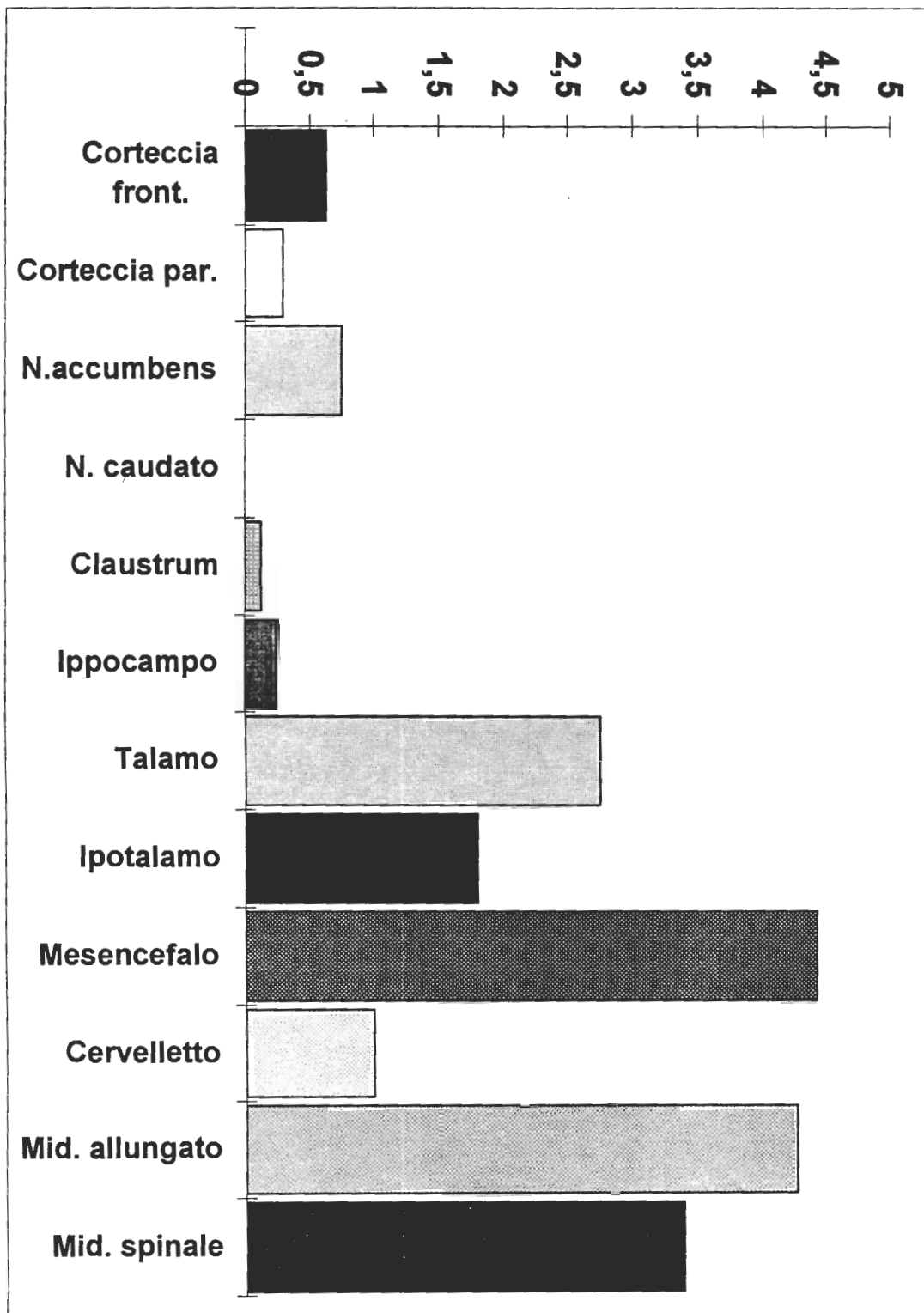
8. Haritani M., Spencer Y.I., Wells G.A.H. (1994). Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol.* 87:86-90.
9. Hadlow W.J. (1961). The pathology of experimental scrapie in the dairy goat. *Res. vet. Sci.* 2:289-318.
10. Williams E.S., Young S. (1993). Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Vet. Pathol.* 30:36-45.
11. Fraser H., Dickinson A.G. (1968). The sequential development of brain lesions of scrapie in three strains of mice. *J. Comp. Pathol.* 78:301-311.
12. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E. (1982). Natural infection of Suffolk Sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.* 146:657-664.
13. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E., Eklund M. (1980). Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie. *Vet. Pathol.* 17: 187-199.
14. Cravero G., Guarda F., Dotta U., Guglielmino R. (1977). La "scrapie" in pecore di razza biellese. Prima segnalazione in Italia. *La Clinica Veterinaria* 100:1-14.
15. Georgsson G., Gísladóttir E., Àrnadóttir S. (1993). Quantitative assessment of the astrocytic response in natural scrapie of sheep. *J. Comp. Path.* 108:229-240.
16. Laplanche J.L., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugere-Picoux J., Launay J.M. (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15:30-37.



**Fig. 1.** Valori medi attribuiti alla spungiosi ed alla vacuolizzazione neuronale di 25 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina .



**Fig.2.** Valori medi attribuiti alla immunoreattività della GFAP di 25 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina.



**Fig. 3.** Valori medi attribuiti alla immunoreattività nei confronti della PrP<sub>sc</sub> di 12 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina.

# **VIGILANZA VETERINARIA SUI PRODOTTI A BASE DI CARNE ALLE SOGLIE DEL TERZO MILLENNIO**

**ROSMINI R.**

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale  
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna*

## **INTRODUZIONE**

Prima di affrontare le problematiche poste dalla vigilanza veterinaria sui prodotti a base di carne occorre ricordare il controllo della materia prima e cioè la carne, anche perché queste giornate di studio hanno luogo nella zona della chianina, razza "suprema", che dalla Valdichiana si è diffusa in tutto il mondo. I bovini di tal razza, produttori di carne dalle ottime caratteristiche organolettiche, sono stati, infatti, esportati in diversi paesi quali Brasile, Argentina, Canada, Inghilterra, Australia e Nuova Zelanda. Scopo di questo lavoro è quindi quello di seguire la filiera produttiva dei prodotti a base di carne cercando di illustrare i compiti dei produttori e della vigilanza veterinaria, alla luce della normativa vigente, al fine di immettere sul mercato prodotti salubri e di qualità.

La vigilanza veterinaria si attua quindi sia negli allevamenti, nei quali vengono controllate l'alimentazione e la salute degli animali, sia nella fase di macellazione degli stessi. A questo proposito occorre ricordare i minuziosi esami previsti sugli animali in fase di macellazione dal D. Lgs. 286/94 già modificato dal D. M. 23-11-1995.

Dall'animale macellato e riconosciuto idoneo al consumo umano traggono origine i prodotti a base di carne la cui produzione e commercializzazione è regolamentata dal D. Lgs. 537/92.

I prodotti a base di carne comprendono, secondo il D. Lgs. 537/92, i prodotti ottenuti da carne o con carne sottoposta ad un trattamento tale che la superficie di taglio al centro permetta di constatare la scomparsa delle caratteristiche della carne fresca, i piatti cucinati a base di carne e cioè i prodotti a base di carne corrispondenti a preparazioni culinarie, cotte o precotte, confezionati e conservati mediante il freddo. Rientrano in questa categoria di prodotti numerosissimi alimenti ottenuti dalla carne e conservati con diversi metodi quali la cottura, l'affumicatura, la salatura in superficie e in profondità, la marinatura e l'essiccazione. Per ricordarne alcuni è sufficiente citare le carni in scatola, i prodotti di salumeria crudi e cotti freschi e stagionati, gli stracotti, i brasati...

Per la prima volta appare, nella normativa sopra citata, l'esigenza di offrire prodotti garantiti non solo da saltuari controlli di organi pubblici, ma anche da continui esami effettuati dai produttori in precisi momenti delle singole produzioni aziendali ben codificati dalle conoscenze scientifiche e documentati

per ogni singolo lotto di prodotto. Tale esigenza ha aperto la via per il cosiddetto "autocontrollo".

L'industria alimentare ha compreso l'utilità dell'autocontrollo nella produzione degli alimenti ben prima che precise norme sanitarie iniziassero a regolamentarne l'applicazione. Furono i produttori di carni lavorate che, a seguito di condanne penali motivate dal fatto che la presenza di batteri patogeni nel prodotto finito ravvisava una condizione di negligenza a livello di processo produttivo, sentirono la necessità di effettuare in proprio le analisi batteriologiche al fine di evitare l'immissione al consumo di carni macinate fresche, in particolare delle salsicce, che per la presenza di germi patogeni, ad esempio salmonelle, potessero risultare pericolose per il consumatore. (Stecchini *et al.*, 1972, Faccini e Furini, 1983 e 1985). Naturalmente si comprese subito che non era sufficiente analizzare solamente il prodotto finito, ma che era indispensabile controllare anche le materie prime, il personale addetto alla lavorazione e le attrezzature utilizzate per poter identificare i punti nei quali si verificava la contaminazione batterica e cercare quindi di controllarla con interventi di sanificazione. Apparve subito di estrema importanza anche la continuità dei controlli che oltre ad essere sistematici dovevano anche avere cadenza almeno settimanale, si intravedeva così il concetto di filiera e la necessità di un piano di controllo durante il processo produttivo e non solo sul prodotto finito.

Iniziarono così le prime applicazioni del **sistema HACCP** che in seguito è stato posto come **principio basilare dell'autocontrollo** da parte della normativa comunitaria e quindi nazionale (Giaccone e Ferri, 1995).

## **L'autocontrollo nella vigilanza veterinaria**

I principi sui quali si fonda l'autocontrollo sono, in gran parte, gli stessi che sostengono il sistema **HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)**, sistema per il controllo preventivo nella produzione degli alimenti che ha incominciato a svilupparsi nel 1959 in seguito alle esigenze che la NASA (National Aeronautics Space Agency) aveva di produrre alimenti estremamente sicuri per gli occupanti delle navicelle spaziali (Bauman, 1994; Adams, 1994).

I principi del sistema HACCP, codificati negli Stati Uniti (USA) dal Comitato nazionale consultivo per i criteri microbiologici degli alimenti, possono essere così riassunti.

### **Principio 1**

**Identificazione dei rischi** che possono essere associati a tutti i momenti della produzione alimentare: dall'ottenimento delle materie prime alla loro lavorazione, confezionamento e distribuzione, senza trascurare, al termine della filiera produttiva, la preparazione e il consumo dei singoli alimenti.

### **Principio 2**

**Determinazione dei punti critici;** ovvero occorre individuare i punti, le procedure di lavorazione o i momenti operativi che devono essere controllati per eliminare o diminuire i rischi. (Punti critici di controllo. CCP). Se il controllo del

punto critico elimina il rischio il CCP è detto **CCP1**, se invece diminuisce solo la probabilità del rischio il CCP è detto **CCP2**.

### **Principio 3**

Stabilire i **limiti critici** che debbono essere rispettati per controllare i CCP.

### **Principio 4**

Identificare un **sistema di monitoraggio** che permetta il controllo dei CCP.

### **Principio 5**

Mettere a punto le **azioni correttive** da effettuarsi quando il monitoraggio evidenzia punti critici fuori controllo.

### **Principio 6**

Stabilire i **metodi di verifica** a conferma della validità del sistema HACCP analizzando la documentazione ottenuta dagli esami fisici, chimici, batteriologici e sensoriali eseguiti nei CCP e sul prodotto finito.

Occorre subito precisare che la messa a punto del sistema HACCP per la filiera produttiva di un determinato prodotto non può essere fatta a priori, ma occorre analizzare sempre sul posto il processo di produzione di ogni alimento. Non esiste quindi la possibilità di confezionare dei sistemi HACCP standard che siano idonei per il controllo di catene di produzione anche simili.

Con l'avvento dell'autocontrollo nell'industria alimentare si è sempre più allargata l'applicazione del sistema HACCP che, orientato inizialmente al controllo di rischi microbiologici, è stato utilizzato in seguito anche per controllare inconvenienti di tipo fisico-chimico oppure modificazioni delle caratteristiche organolettiche degli alimenti (Paparella, 1993).

A completamento dell'autocontrollo è indispensabile estendere il concetto di controllo dei CCP a livello degli operatori della catena alimentare, curando, inoltre, la loro formazione al fine di assicurare che vengano seguite le buone pratiche di produzione e distribuzione. Il rispetto delle buone pratiche di laboratorio risulta indispensabile poi per gli Istituti di analisi che sostengono i vari piani HACCP (Comi *et al.*, 1995).

## **L'autocontrollo nella vigilanza veterinaria sugli alimenti carnei**

L'autocontrollo, eseguito spontaneamente da alcuni produttori allo scopo di salvaguardare il marchio della ditta, è stato recepito abbastanza recentemente dalla legislazione sanitaria.

Sono state emanate, infatti, norme generali, come la direttiva 93/43 CEE sull'igiene dei prodotti alimentari, e provvedimenti legislativi più specifici che hanno introdotto l'autocontrollo nel settore degli alimenti carnei. Si ricorda per le carni fresche, dei classici animali da macello, il D. Lgs 286/94, modificato dal

D.M. 23-11-1995, per le carni fresche dei volatili da cortile il D.P.R. 503/82, modificato dal D.P.R. 193/88, per le carni macinate e le preparazioni di carne il D.P.R. 227/92, per i prodotti a base di carne il D. Lgs 537/92 e per le carni di selvaggina uccisa la direttiva 92/45 CEE. Per le carni di conigli e di selvaggina d'allevamento nel D.P.R. 559/92 non vi è un preciso riferimento all'autocontrollo, ma si rimanda alla normativa riguardante le carni dei volatili da cortile.

Non sono state emanate ancora precise disposizioni riguardanti l'autocontrollo in settori a rischio, per possibili tossinfezioni alimentari, quale quello della ristorazione collettiva, tuttavia è indubbio che ormai tale procedimento di controllo diventerà sempre più una realtà in tutto il comparto alimentare, visto che già nella stessa ristorazione collettiva il servizio veterinario ha le basi teoriche per poter eseguire la vigilanza cercando di utilizzare il sistema HACCP (Taubert, 1982).

Gli obiettivi che l'autocontrollo si propone sono diversi, ma due sono i principali. Il primo, anche per importanza, è prettamente sanitario, ovvero garantire, con un piano di controllo preventivo, come previsto dalla normativa, alimenti salubri al fine di evitare le tossinfezioni alimentari. Il secondo obiettivo, di natura più politica, è quello di conferire al produttore il compito del controllo preventivo stesso. Questo si è reso indispensabile in seguito allo sviluppo sempre più massiccio dell'industria alimentare che non permette più di sostenere l'ispezione e la vigilanza esclusivamente con controlli del servizio veterinario delle U.S.L. che risultano purtroppo saltuari, di solito terminali e quindi non sempre efficaci, almeno sul piano della prevenzione. Per questo motivo si è ritenuto che la responsabilizzazione del produttore per il tramite dell'autocontrollo porterà all'immissione al consumo di alimenti sempre più sicuri dal punto di vista sanitario. Il produttore di conseguenza ottiene un evidente guadagno d'immagine, infatti altro obiettivo, non ricordato dalla normativa per l'autocontrollo, ma che si tende ad ottenere con l'applicazione del sistema HACCP è il raggiungimento della **qualità totale**.

Chiaramente il fatto di riconoscere per legge l'autocontrollo non vuole dire ridurre il compito che il servizio veterinario deve svolgere nell'ispezione degli alimenti di origine animale, al contrario, con un efficace **controllo dell'autocontrollo** verrebbe sicuramente valorizzata la vigilanza veterinaria con una notevole diminuzione delle principali tossinfezioni alimentari trasmesse dal consumo di carne e da prodotti a base di carne.

L'obiettivo di produrre alimenti salubri è stato da sempre alla base dell'ispezione veterinaria. Da tempo sono conosciuti i problemi posti dal botulismo, dalle salmonellosi, dalla trichinellosi, ed anche da forme virali come quella sostenuta dal virus dell'epatite tipo A (Ahmed, 1992). Il servizio veterinario si è però dedicato anche ad altri patogeni che, ora come vecchie conoscenze, ora come patogeni emergenti, hanno determinato delle difficoltà nella produzione, commercializzazione, distribuzione, preparazione e consumo degli alimenti di origine animale. E' sufficiente ricordare *S. aureus*, *C. perfringens*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholera*, *E. coli*, Yersinia, Listeria, Shigella (Lechowich, 1992).

Gran parte dei patogeni emergenti nel settore alimentare vanno ricercati tra i microrganismi che sono riusciti a sopravvivere e a moltiplicarsi nonostante

la presenza della **catena del freddo**. Come l'utilizzo del freddo ha evidenziato patogeni prima poco conosciuti, così le sempre più sofisticate **tecniche d'allevamento** degli animali hanno messo di fronte l'ispezione veterinaria a problematiche conseguenti l'impiego di nuove molecole sia ad azione terapeutica che anabolizzante. Recentemente è balzata sulle tavole dei consumatori anche la psicosi della "**vacca pazza**"; con questa denominazione si fa riferimento ad una malattia a decorso irreversibile e a eziologia non completamente chiarita, trasmessa da ovini e caprini ai bovini per mezzo di mangimi contenenti proteine ovi-caprine. Le esigenze della zootecnia per sempre maggiori produzioni di carne e latte hanno, infatti, portato alla preparazione di mangimi per bovini, ma anche per altre specie animali, partendo da tessuti di pecore e capre in alcuni casi ammalate o portatrici di una sindrome ben conosciuta la "scrapie", con la conseguente trasmissione della malattia al bovino. In questi animali la malattia, descritta per la prima volta in Gran Bretagna negli anni 1985-86 e denominata encefalopatia spongiforme (Bovine spongiform encephalopathy - BSE), presenta una grave sintomatologia nervosa ad esito sempre letale. Altro problema per la vigilanza veterinaria è quindi dato dal controllo di queste patologie al fine di impedire la loro possibile trasmissione all'uomo. Si ricorda che negli umani è descritta una malattia simile alla BSE e denominata sindrome di Creutzfeldt-Jacob, ancora non correlata con certezza alle patologie similari riscontrate negli animali da macello e che fortunatamente per ora ha una incidenza bassissima, circa un caso su un milione (Marsh, 1993; Wilesmith, 1993; Smith e coll., 1995; Clark e coll., 1995).

Anche l'**ambiente** ha offerto con il passare del tempo nuovi motivi di ricerca nel campo ispettivo; sempre maggiori sono risultate le possibilità che negli alimenti residuassero, ad esempio, molecole di fitofarmaci, metalli pesanti ed altri inquinanti quali, ad esempio, le micotossine. Infine i produttori con l'utilizzo degli additivi alimentari per fini diversi, conservante, antiossidante, stabilizzante, addensante e colorante, hanno contribuito non poco ad aumentare le sostanze chimiche, non sempre gradite al consumatore, nel prodotto finale.

E' indubbio che la vigilanza veterinaria, a fronte sia dei rischi microbiologici che del pericolo di residui di sostanze indesiderate negli alimenti e a seguito della loro sempre maggiore produzione e rapida commercializzazione, non poteva assicurare interventi tempestivi e quindi efficaci soprattutto a livello di controllo preventivo.

L'autocontrollo è diventato, quindi, indispensabile.

Anche dal punto di vista di una politica ispettiva, volta a salvaguardare sia l'immagine del produttore che la salute del consumatore, l'introduzione dell'autocontrollo porterà sicuramente al miglioramento dell'ispezione dei prodotti alimentari. I produttori lungimiranti hanno già da tempo intuito la funzione del sistema HACCP finalizzato al raggiungimento della **qualità totale** degli alimenti con il **controllo del processo** e la **verifica del prodotto**. Non è facile definire un alimento di qualità totale, tuttavia si può affermare che, di solito, risponde a questo requisito l'alimento che soddisfa tutti, produttori e consumatori.

Nell'applicazione dell'autocontrollo sarà facile convincere i produttori dimostrando i vantaggi che ne deriveranno, mentre più difficile sarà applicare correttamente i principi del sistema HACCP per ogni filiera produttiva

(Christian, 1994). **Identificare i rischi, determinare i punti critici, stabilire i limiti critici per il controllo dei CCP, impiantare il monitoraggio dei CCP, indicare le azioni correttive sui CCP fuori controllo, stabilire le verifiche sulla documentazione acquisita con le indagini fisiche, chimiche, microbiologiche e sensoriali effettuate.** Basti pensare che già con la legge 283, del 30 aprile 1962, è iniziato il cammino della determinazione di **standard microbici e dei livelli di residui di sostanze indesiderate** negli alimenti, che è risultato subito pieno di difficoltà. A tutt'oggi per molti alimenti non vi sono standard microbici né per molte molecole vi sono livelli di accettabilità, molti di questi non si avranno mai, quelli già stabiliti tendono ad essere modificati al rialzo e questo avviene, per ovvi motivi, soprattutto per quanto riguarda i contaminanti ambientali.

Tale situazione d'incertezza non favorisce sicuramente l'applicazione del sistema HACCP. Alcuni esempi sono sufficienti per illustrare il problema. La presenza di **sostanze anabolizzanti** negli alimenti troverà risoluzione con il sistema HACCP? Sicuramente no. Si discute ancora su vecchie molecole ad **azione estrogena o androgena** e già sono utilizzate nuove sostanze ad azione **beta-agonista** o nuovissimi **prodotti a base di cromo**. Sarà facile identificare il rischio cromo, stabilire i punti critici e determinare i limiti per il loro controllo? Questi dubbi valgono per molte altre sostanze indesiderate.

Che dire poi delle cariche microbiche? Vi sono incertezze sui valori limite da assegnare anche a certi germi considerati patogeni a maggior ragione vi sono difficoltà nell'individuare limiti critici di cariche microbiche totali o di enterobatteri o di patogeni minori in prodotti alimentari quali carni trite, preparazioni di carni e i prodotti a base di carne.

Con la diffusione nei ruminanti da macello di encefalopatie sostenute da agenti infettanti non convenzionali denominati **prioni**, come si è verificato in Gran Bretagna con la malattia della "**vacca pazza**", appare evidente l'estrema difficoltà in cui viene a trovarsi la vigilanza veterinaria nell'identificare i rischi e nel determinare i punti critici e cioè le procedure di lavorazione per diminuire o eliminare i rischi. Quando non si conosce bene l'agente patogeno per quanto riguarda, ad esempio, le possibilità della sua trasmissione da un animale all'altro o dall'animale all'uomo diventa difficile identificare i rischi e se l'agente eziologico è dotato anche di notevole resistenza al calore, a sostanze chimiche ad azione disinfettante o a additivi alimentari ad azione conservante, come sembra essere il prione, diventa problematico stabilire i punti critici ovvero i metodi da utilizzare per rendere il prodotto alimentare idoneo al consumo umano.

Un inconveniente dell'autocontrollo, con il metodo HACCP, potrebbe emergere nel portare a termine il monitoraggio per il controllo dei CCP. Ovviamente se tale **monitoraggio** non è **sistematico** produce una notevole diminuzione dell'efficacia dell'autocontrollo.

Non vi sono invece troppe difficoltà nello stabilire l'azione correttiva nel caso in cui i CCP vadano fuori controllo, questo grazie ai livelli raggiunti dalla moderna tecnologia alimentare.

Un discorso a parte meritano i CCP, suddivisi in CCP1, quando un intervento in quel punto elimina completamente il rischio, e CCP2, quando pur intervenendo in quel punto non si riesce ad eliminare totalmente il rischio.

Esaminando i CCP in un qualsiasi processo produttivo si osserva che i CCP1 sono pochi e si identificano con l'applicazione del freddo, oppure con l'applicazione del calore, o con la stagionatura prolungata. E' quindi evidente che il sistema HACCP non ha evidenziato nulla di nuovo nella conservazione degli alimenti, ma ha applicato principi conosciuti da centinaia di anni. Il **merito dell'HACCP** è stato quello di far sentire ai produttori l'esigenza di un **continuo monitoraggio** sulla filiera produttiva con la gestione corretta dei CCP1. Questo però non faccia pensare che i CCP2 non siano importanti, infatti senza il controllo continuo dei CCP2 i CCP1 possono diventare difficilmente gestibili. Tradotto in termini più intuitivi, se viene messa in scatola materia prima fortemente inquinata questa, al CCP1, e cioè nel momento dell'applicazione del calore, può risultare difficilmente sterilizzabile.

Occorre poi ricordare la complessità della messa a punto del sistema di autocontrollo in un qualsiasi processo produttivo (Comi *et al.*, 1995). Essa si evidenzia subito dall'esame di un **piano generale d'igiene**, e in modo particolare esaminando nel dettaglio l'**igiene del personale**. Lavarsi regolarmente, cambiare il vestiario, almeno settimanalmente, tenere le unghie corte, non portare braccialetti, orologi da polso o anelli durante la lavorazione, lavarsi le mani e disinfettarle regolarmente prima dell'inizio del lavoro, dopo ciascuna pausa, ma soprattutto dopo l'uso della toilette; asciugarsi le mani con asciugamani a perdere, indossare durante il lavoro vestiti idonei, puliti e con copricapo che riesca a contenere efficacemente la capigliatura. Sono questi **comportamenti elementari d'igiene** che, qualora non vengano scrupolosamente seguiti dal personale addetto alle filiere produttive, possono compromettere qualsiasi piano di autocontrollo. Anche solamente il sovraccarico di personale negli spogliatoi, si è dimostrato capace di portare una eccessiva carica batterica nell'ambiente di lavorazione con conseguenti problemi nell'autocontrollo. Saranno di aiuto nell'approntare i piani di autocontrollo l'utilizzo dei manuali di corretta prassi igienica, come previsto dalla circolare 28-7-1995, n. 21 del Ministero della Sanità, che avrà anche cura di adeguare, in breve tempo, la normativa riguardante l'autocontrollo nelle diverse filiere produttive.

Infine compito principale della vigilanza veterinaria alle soglie del terzo millennio sarà il **controllo dell'autocontrollo**, intendendo la verifica ufficiale dell'autocontrollo da parte del servizio veterinario da effettuarsi con il controllo della documentazione risultante dagli esami effettuati per l'autocontrollo e con eventuali esami supplementari.

Occorre ricordare al termine di questa analisi un punto critico che potrebbe costituire una nota particolarmente dolente: il **costo dell'autocontrollo**.

Applicare indiscriminatamente il sistema HACCP, individuando rischi ovunque con numerosi punti critici da tenere sotto continuo controllo, potrebbe far raggiungere costi di gestione non facilmente sopportabili dall'industria e nemmeno dal consumatore. Se l'autocontrollo non verrà eseguito da seri professionisti, esso finirà per creare solo una **parvenza di vigilanza**, inefficace, sia nel controllo delle più banali **tossinfezioni alimentari**, che nel supporto della futura e tanto auspicata **qualità globale**.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams C. E. (1994) HACCP as applied in the USA. *Food control* 5 (3), 187.
2. Ahmed F. E. (1992) Review: assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with micro-organisms, parasites, and natural toxins in the US. *International Journal of Food Science and Technology* 27, 243.
3. Bauman H.E. (1994) The origin of the HACCP system and subsequent evolution. *Food Science and Technology Today* 8 (2), 66.
4. Christian J. H. B. (1994) Problems with HACCP. *Food Australia* 46 (2), 81.
5. Circolare 28 luglio 1995, n. 21 del Ministero della Sanità. Disposizioni riguardanti le linee guida per l'elaborazione dei manuali volontari di corretta prassi igienica in materia di derrate alimentari. G. U. del 10-8-1995, serie generale, n. 186.
6. Clark W. W., Hourrigan J. L., Hadlow W. J. (1995) Encephalopathy in cattle experimentally infected with the scrapie agent. *Am. J. Vet. Res.*, 56(5), 606.
7. Comi G., Cantoni C., Duratti, G. (1995) Criteri generali per l'impostazione del controllo e ruolo del laboratorio di analisi nel contesto dell'autocontrollo. *Ingegneria alimentare* 1,7.
8. Faccini G., Furini M. (1983) Il problema della presenza di salmonelle nelle carni lavorate (insaccati freschi-salsicce) aspetti igienici e giuridici. *Industrie alimentari* 11, 825.
9. Faccini G., Furini M. (1985) Nuovi aspetti dell'inquinamento salmonellare di alcune carni fresche lavorate rilevati in salumifici e laboratori che effettuavano in proprio le analisi batteriologiche. *Industrie alimentari* 13, 15
10. Giaccone V., Ferri M. (1995) L'HACCP come sistema di autocontrollo. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 6, 35 e 7/8, 31.
11. Lechowich R. V. (1992) Current concerns in food safety. *Acs Symposium series 484, Food safety assessment* 22, 233. American Chemical Society, Washington.
12. Marsh R.F. (1993) Bovine spongiform encephalopathy: a new disease of cattle? *Arch. Virol. Suppl.* 7, 255.
13. Paparella A. (1993) Autocontrollo e HACCP nell'industria di macellazione e sezionamento delle carni fresche. *Atti del II° Convegno nazionale A.I.V.I. Puglia Grafica*, pag. 93, Valenzano, Bari.
14. Smith P. E., Zeidler M., Ironside J. W., Estibeiro P., Moss T.H. (1995) Creutzfeldt-Jakob disease in a dairy farmer. *Lancet (letter)*, Sep. 30, 346(8979): 898.
15. Stecchini M., Cossa M. T., Caserio G., Mennella P., Patano C. (1972) Sulla sopravvivenza di salmonelle in carni macinate congelate di pollo e di bovino adulto. *Industrie alimentari* 2, 137.
16. Taubert C. A. (1982) Defining sanitation hazards and critical control points in foodservice operations. *Journal of foodservice systems* 2, 171.
17. Wilesmith J. W. (1993) Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Arch. Virol. Suppl.*, 7, 245.

# ***PATOLOGIA ATROFICA E DISPLASICA DEL FOLLICOLO PILIFERO***

DELLA SALDA L.

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale  
Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica  
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna*

## **CENNI ANATOMICI DELL'UNITÀ PILO-SEBACEA.**

Il pelo, peculiare struttura dei mammiferi, svolge funzioni fondamentali nell'isolamento termico, nella percezione sensoriale e come barriera nei confronti di diversi agenti potenzialmente dannosi alla pelle.

I follicoli piliferi si sviluppano dalla proliferazione del germe pilifero embrionario, di origine ectodermica, verso il sottostante mesoderma, ed il loro numero e la distribuzione è determinata geneticamente.

Nel cane e nel gatto i follicoli piliferi sono composti, costituiti da gruppi di peli primari, in genere da due a cinque, circondati da peli secondari, anche essi midollati, in numero variabile fino a 15-16. Per ogni pelo primario sono presenti una ghiandola sebacea, una ghiandola sudoripara ed un muscolo erettore del pelo, ed inoltre ogni pelo emerge alla superficie della pelle da una apertura indipendente, mentre i peli secondari sono accompagnati solo dalle ghiandole sebacee ed emergono attraverso un orifizio follicolare esterno comune.

Il follicolo pilifero ha cinque maggiori componenti: la *papilla dermica* del pelo che insieme alle cellule della *matrice del pelo* danno origine al *pelo* e alla *guaina epiteliale interna*, mentre la *guaina epiteliale esterna* rappresenta una introflessione dell'epidermide. Le cellule della matrice sono paragonabili a quelle dello strato basale o germinativo dell'epidermide, tuttavia hanno una potenzialità diversa, in quanto vanno incontro ad una cheratinizzazione c.d. tricolemmale, più brusca, priva dello strato granulare e caratterizzata dalla formazione di una cheratina più dura ( $\alpha$  cheratina) e coesiva rispetto a quella dell'epidermide che è molle e sfaldabile in piccole scaglie. Esternamente vi è la zona della *membrana basale* comprendente la membrana vitrea e tessuto connettivo denso.

Il follicolo pilifero si può dividere in tre segmenti anatomici. Nell'*infundibolo* o regione pilo-sebacea (parte più esterna che comprende il segmento che va dall'entrata del dotto sebaceo alla superficie cutanea) si osserva una cheratinizzazione di tipo identico a quella epiteliale, mentre nell'*istmo* (parte che va dall'entrata del dotto sebaceo all'inserzione del muscolo erettore del pelo) si ha una cheratinizzazione di tipo tricolemmale. La parte più profonda che si estende dall'inserzione del muscolo erettore del pelo alla papilla dermica del pelo viene definita *segmento inferiore*. Nei peli in attivo accrescimento questa porzione presenta una base arrotondata detta bulbo del pelo.

Il processo di cheratinizzazione nell'epidermide è continuo, mentre quello del follicolo (o più propriamente del segmento inferiore) è intermittente, perciò i peli non crescono continuamente, ma seguono un ciclo che consiste in

un periodo di crescita (*anagene*), durante il quale il follicolo produce attivamente il pelo, in un periodo di transizione (*catagene*) ed in un periodo di riposo (*telogene*), in cui il pelo rimane passivamente all'interno del follicolo (pelo clavato) per poi cadere sospinto all'esterno dal nuovo pelo che si accresce. Il ricambio del pelo avviene a mosaico, cioè follicoli piliferi contigui sono, in un dato momento, in diversi stadi del ciclo. L'aspetto istologico dei follicoli piliferi varia in relazione allo stadio del ciclo del follicolo.

Tale ciclo, e quindi la presenza di un mantello uniforme e più o meno folto, è influenzato dal fotoperiodo, dalla temperatura ambientale, dall'alimentazione, dagli ormoni, dallo stato di salute generale, da fattori genetici e da fattori intrinseci per lo più sconosciuti.

### **PATOLOGIA DEL FOLLICOLO PILIFERO.**

Una alterata influenza dei fattori sopra elencati, assieme ad insulti fisici e chimici, stress e fattori immunologici, direttamente o indirettamente si ripercuote sul follicolo pilifero e sulle annesse ghiandole (unità pilo-sebacea), interferendo con il loro sviluppo, la loro struttura o il ciclo di crescita del pelo. Sebbene un coinvolgimento del follicolo pilifero possa essere occasionalmente o costantemente associato a quasi tutte le dermatosi conosciute, verranno qui brevemente passati in rassegna gli aspetti istologici e patogenetici delle più importanti malattie che direttamente colpiscono il follicolo pilifero e/od il ciclo di crescita mediante un meccanismo eziopatogenetico non infiammatorio.

Clinicamente tali patologie si manifestano generalmente con alopecia o ipotricosi generalizzata, nella maggior parte simmetrica e bilaterale, non pruriginosa. Il termine alopecia può essere impiegato per indicare la diminuzione in numero assoluto dei peli in una determinata area, ma anche la diminuita lunghezza, cioè la presenza di peli più corti anche se numericamente nella norma. In genere l'alopecia non viene diagnosticata fino a che non si è verificata la caduta di almeno il 30% dei peli, ed è in genere una manifestazione graduale che si osserva a malattia insorta già da un certo tempo.

L'alopecia può essere classificata in congenita o acquisita, da un punto di vista prognostico si possono differenziare le alopecie acquisite in cicatriziali e non (tab.1).

Le alopecie cicatriziali, in genere permanenti, comprendono quelle patologie associate a distruzione o distorsione del follicolo pilifero, in parte dovuta a fibrosi, che solitamente sono secondarie ad un processo infiammatorio. Nelle alopecie non cicatriziali la perdita di pelo è dovuta a malformazioni intrinseche, ad alterazioni degli stimoli sistemici o locali che mantengono normale il ciclo del pelo o ad anomalie del trasferimento melanosomiale. Queste patologie di norma non si presentano inizialmente eritematose, in quanto il meccanismo patogenetico non comporta l'insorgenza di processi infiammatori, tuttavia molte di esse, soprattutto le endocrinopatie, sono notevolmente predisposte a sviluppare piodermiti o seborrea secondarie

L'ipertricosi si manifesta raramente in tali affezioni. Essa si può osservare in disendocrinie come l'ipotiroidismo nel cane, specialmente nelle razze Boxer e Setter irlandese, nell'ipercorticosurrenalismo nel cavallo, nell'acromegalia legata ad un elevato livello serico dell'ormone della crescita e nell'ipertricosi sensibile agli estrogeni nel cane.

Le follicolopatie che riconoscono un meccanismo patogenetico non infiammatorio possono essere suddivise istologicamente in malattie atrofiche e malattie displasiche del follicolo pilifero (tab. 2).

Le malattie atrofiche sono principalmente quelle nelle quali il follicolo pilifero presenta un arresto del ciclo di crescita, o atrofia "fisiologica", in molti casi associata ad una "vera" atrofia, cioè una riduzione delle dimensioni del follicolo pilifero nei vari stadi del ciclo rispetto a quelle osservabili in condizioni normali. Tale atrofia interessa anche le ghiandole sebacee, mentre mancano anomalie strutturali del follicolo e del fusto del pelo o difetti di pigmentazione melanica che sono tipici delle malattie displasiche.

### **MALATTIE ATROFICHE DEL FOLLICOLO PILIFERO.**

Queste possono essere convenientemente suddivise ulteriormente nelle patologie la cui eziopatogenesi è metabolica (malattie disendocrine, stati carenziali), ischemica o da cause varie.

Le **endocrinopatie** sono indubbiamente le dermatosi metaboliche con atrofia del follicolo più importanti e frequenti nei carnivori domestici. L'ipo-iper tiroidismo, l'ipo-iper estrogenismo, l'ipercorticosurrenalismo e l'iposomatotropismo sono le forme più comunemente accertate: Esistono poi numerose forme per le quali non è possibile stabilire se siano dovute alla carenza o all'eccesso di un determinato ormone, all'azione combinata di più ormoni o da cause ormonali associate a cause locali. Esse vengono definite "dermatosi che rispondono alla castrazione, al testosterone, all'ovaristerectomia, agli estrogeni, all'ormone della crescita", "alopecia simmetrica felina", "sindrome della pelle fragile felina".

La causa di molte disendocrinie risiede in processi patologici (atrofia, infiammazione, tumore) a livello ipotalamico, ipofisario o tiroideo che riducono o aumentano la produzione o il rilascio di un ormone o di un suo precursore. Per alcune il meccanismo patogenetico della perdita del pelo non è ancora compreso del tutto. E' chiaro tuttavia che vi è differente sensibilità agli ormoni tra le varie specie ed una differente densità o attività di recettori follicolari per alcuni ormoni (ormoni sessuali) da una regione all'altra del corpo. Non dimentichiamo inoltre che anche la pelle ha una funzione endocrina come sede per il metabolismo di molte sostanze steroidee. L'ipotiroidismo, la più comune dermatosi endocrina del cane, comporta atrofia dell'epidermide e anormale cheratinizzazione, riduzione della sintesi proteica, sono rallentati l'attività mitotica ed i processi ossido-riduttivi. Il ciclo di crescita del pelo viene alterato perché la fase anagenica non è stimolata ad iniziare, così il follicolo pilifero rimane nella fase telogena per lungo tempo. Nell'ipercorticosurrenalismo l'effetto catabolico proteico, antienzimatico ed antimitotico dei glicocorticoidi comporta inibizione dell'attività follicolare, rallentata crescita del pelo e diminuzione del diametro, mentre la zona della membrana basale del follicolo diviene sottile ed interrotta. L'ormone somatotropo accelera lo sviluppo del pelo, ne aumenta la lunghezza e induce l'inizio della fase anagenica, gli estrogeni la inibiscono, mentre gli androgeni possono avere un effetto stimolante o deprimente su tale fase.

Diverse ricerche sono state effettuate nel tentativo di differenziare le endocrinopatie mediante indagini morfologiche, tuttavia la maggior parte dei

risultati indicano che, indipendentemente dall'ormone in causa, molti aspetti istologici sono comuni (tab. 3).

La maggioranza dei follicoli piliferi sono atrofici e caratteristicamente fermi in fase catagena o telogena. In quelli fermi da lungo tempo in fase catagena si osserva una eccessiva cheratinizzazione tricolemmale della guaina pilifera esterna, dove la cheratina prodotta da tale guaina si fonde con quella del pelo dando ai follicoli aspetti c.d. a fiamma. E' probabile che questo aspetto sia la conseguenza di un prolungato arresto nella fase catagena, tuttavia potrebbe trattarsi anche di una vera e propria alterazione dei follicoli in tale fase indotta dalla disendocrinia. Follicoli "a fiamma" sono stati visti nell'iposomatotropismo del cane adulto, nell'iperestrogenismo, nell'ipotiroidismo ed in molte altre disendocrinie ma anche nell'alopecia dopo tosatura e nella displasia follicolare del cane Siberian Husky. Alcune recenti osservazioni indicano che alcune razze canine, come lo Chow Chow o i Volpini di Pomerania, presentano una predisposizione maggiore a sviluppare tali follicoli in conseguenza di stimoli atrofizzanti.

L'atrofia dell'epidermide e l'ipercheratosi dell'epidermide e degli infundibuli piliferi sono generalmente espressi in tutte le endocrinopatie, specialmente nell'ipercorticosurrenalismo dove l'ipercheratosi follicolare è talvolta così imponente da determinare la dilatazione cistica dell'infundibolo; tuttavia una certa percentuale di cani ipotiroidei, carenti dell'ormone somatotropo o affetti da sertolioma testicolare possono presentare acantosi epidermica e follicolare.

In tutte le endocrinopatie, specialmente nelle forme croniche, si osserva una iperpigmentazione dell'epidermide, ma nella sindrome di femminilizzazione del cane maschio affetto da sertolioma tale carattere è talora piuttosto intenso.

In determinate malattie sono talvolta presenti alcuni reperti istologici particolari che, associati a quelli generici di endocrinopatia, permettono di poter effettuare una diagnosi più precisa, seppure con opportune considerazioni. Questi aspetti sono l'ipertrofia e la vacuolizzazione del muscolo erettore del pelo nonché il mixedema nell'ipotiroidismo; la mineralizzazione del collagene dermico, della guaina pilifera esterna e della membrana basale, derma sottile e disorganizzato (gatto), e flebectasia dei capillari dermici nell'ipercorticosurrenalismo; la riduzione o l'assenza di fibre elastiche nell'iposomatotropismo.

Per quanto riguarda il mixedema, questa è una situazione che si osserva nell'ipotiroidismo in almeno il 30 % dei casi. Occorre tuttavia tenere conto che nello Shar-pei, razza canina per altro molto predisposta a tale patologia, la presenza di mucina nel derma è una condizione normale. Esiste inoltre una entità patologica ben distinta ed alquanto rara nel cane e nel gatto, definita mucinosi follicolare, in cui vi è un intenso infiltrato di leucociti mononucleati perifollicolare, spongiosi e degenerazione della guaina epiteliale esterna con formazione di spazi cistici ripieni di mucina.

Nel caso di mineralizzazione perifollicolare della membrana vitrea bisogna considerare che essa si osserva comunemente nei cani anziani, in alcune razze (Barboncini nani) e deve essere differenziata dalla mineralizzazione nella calcinosi cutanea.

La diminuzione o l'assenza delle fibre elastiche nell'iposomatotropismo è più facilmente evidenziabile con l'utilizzo di colorazioni istologiche specifiche per tali fibre (Orceina van Gieson), ma questo carattere può essere presente solo nei soggetti che presentano la patologia da due anni o più, ed inoltre è una condizione difficilmente valutabile che richiede biopsie di controllo in quanto varia da soggetto a soggetto e da zona a zona.

Nell'ipercorticossurrenalismo del gatto il derma appare istologicamente non mineralizzato, ma edematoso, sottile e con ampie separazioni tra le fibre collagene, le quali sono disposte in modo irregolare. Questa alterazione dermica è responsabile della facile lacerabilità della pelle ai minimi traumatismi osservabile nei gatti affetti da tale disendocrinia.

Gli aspetti vacuolari del muscolo erettore del pelo e delle ghiandole sebacee presenti nell'ipotiroidismo sono stati recentemente riportati come caratteri non specifici o addirittura normali.

Numerose sono le **sostanze alimentari** che influiscono in maniera complessa sullo sviluppo e sul ciclo del pelo e la cui carenza si manifesta con alterazioni clinicamente ed istologicamente evidenti (tab. 4). Il pelo è costituito per oltre il 90% di cheratina e proteine contenenti gli aminoacidi cisteina, arginina e tirosina; la normale crescita del pelo ed il processo di cheratinizzazione richiede circa il 25% delle necessità giornaliere di proteine, conseguentemente la carenza proteica rappresenta in definitiva la più importante causa di alopecia alimentare, nel corso della quale la osservazione microscopica della pelle evidenzia anomalie strutturali dei follicoli piliferi, diminuzione del diametro e della lunghezza del pelo.

L'indagine istologica suggerisce che alla base di alcune patologie atrofiche del pelo vi sia un processo ischemico; sia nella **dermatomiosite familiare** che nella **alopecia da vaccinazione antirabbica** nel cane compare infatti una flogosi perivascolare cagionante una ridotta o mancata irrorazione sanguigna del bulbo pilifero o di altri segmenti follicolari. Nella dermatomiosite familiare, dal comportamento ereditario e dalla causa sconosciuta, l'essudazione infiammatoria, oltre che intorno ai vasi del derma, è perifollicolare ed i follicoli piliferi sono atrofici con alterazioni vacuolari e necrosi di alcuni cheratinociti della guaina epiteliale esterna. Tali vacuolizzazioni sono anche osservabili nella alopecia che consegue ad una pannicolite quale infrequente evento reattivo dopo l'inoculazione del vaccino antirabbico, nella quale il rilevamento attorno ai vasi dell'ipoderma di depositi di anticorpi contro il virus della rabbia e la presenza di alterazioni degenerative endoteliali indicano la natura immunitaria della perivasculite. L'infiammazione, in questo caso dell'ipoderma, può indurre una atrofia follicolare su base ischemica sia interferendo con l'integrità vascolare che per compressione sul follicolo. Talvolta come conseguenza dell'infiammazione o dell'alterato apporto sanguigno esita una fibrosi perifollicolare che peggiora ulteriormente la situazione ischemica.

Indotta da un meccanismo ischemico potrebbe essere anche la mancata ricrescita del pelo che si manifesta talora nei cani di alcune razze poco tempo dopo essere stati tosati (**alopecia post tosatura**). Caratteristica di tale patologia è la presenza di follicoli piliferi di dimensioni normali ma quasi tutti fermi in fase catagena. Il meccanismo responsabile dell'induzione del ciclo in fase catagena non è conosciuto. Tra le ipotesi si ritiene che una ridotta irrorazione sanguigna

del follicolo pilifero, secondaria a vasocostrizione in pelli depilate, porti ad una prematura terminazione della fase anageno e successivo arresto in fase catageno. La quasi esclusiva limitazione di questa patologia in cani di razze nordiche fa ritenere che l'intensa vasocostrizione sia un adattamento fisiologico geneticamente stabilito per ridurre la perdita di calore in animali selezionati a vivere in paesi dal clima freddo. L'istologia evidenzia inoltre diversi follicoli "a fiamma".

Nell'**effluvio telogeno od anageno**, condizioni abbastanza rare caratterizzate da brusca caduta del pelo con alopecia totale, la rapida e prematura cessazione dello sviluppo anageno porta alla sincronizzazione del ciclo follicolare, così che i peli cadono (defluvio anageno) o procedono all'unisono attraverso la fase catageno e telogeno (defluvio telogeno). Entrambe insorgono in risposta a diversi stress metabolici, più gravi per il deflusso anageno, quali malattie febbrili, shock, gravidanza o gravi tossicosi da farmaci. Come per la precedente affezione, l'istologia evidenzia solamente una atrofia fisiologica nel deflusso telogeno, mentre in quello anageno vi sono anche aspetti displasici e degenerativi del follicolo e del pelo.

Non sostenuta da una causa organica evidente, ma ritenuta essere una nevrosi ansiosa in gatti dal carattere nervoso, è invece l'**alopecia psicogena felina**. All'esame istologico la cute risulta normale mentre i peli appaiono spezzati a causa dell'azione traumatica prodotta dal continuo ed ossessivo leccamento.

L'effetto traumatico esercitato da elastici, mollette ed altro usati per scopi estetici sul pelo in alcune razze canine è anche alla base della c.d. **alopecia da trazione**, forma clinica simile alla tricotillomania nell'uomo e ritenuta essere dovuta ad una interferenza con la circolazione sanguigna. Istologicamente l'epidermide è normale mentre i follicoli piliferi sono caratterizzati da estrema riduzione di dimensione ed in fase telogeno. Vi è cheratosi follicolare ed una blanda infiltrazione perifollicolare di cellule infiammatorie, mentre nelle forme croniche compare una densa fibrosi attorno e tra i follicoli atrofici.

Quest'ultimo aspetto si osserva anche, sebbene in forma più grave per la completa assenza dei follicoli piliferi, nell'**alopecia cicatriziale**. In tale situazione si ha un danno permanente del follicolo pilifero per cui non ricresce più il pelo. Sono in causa varie noxe patologiche, infiammatorie o non (tossiche, meccaniche), che lesionano profondamente il follicolo pilifero fino alla sua eliminazione e sostituzione con tessuto fibroso disposto in fasci laminari orizzontali. L'istopatologia può essere utile per differenziare le varie cause di alopecia cicatriziale.

## **MALATTIE DISPLASICHE DEL FOLLICOLO PILIFERO.**

Le malattie displasiche del pelo sono genericamente caratterizzate da alopecie progressive e permanenti dovute ad anomalie nello sviluppo del follicolo pilifero e nella crescita del pelo, oltre che ad un difettoso processo di produzione o trasporto della melanina. Sebbene tali aspetti possano anche essere acquisiti in seguito all'azione di sostanze tossiche, carenze alimentari o dei raggi solari, per convenzione si classificano come malattie displasiche solo quelle ereditarie o ritenute tali in quanto strettamente correlate a determinate razze canine o feline.

Nelle displasie follicolari ereditarie l'alopecia può essere presente o svilupparsi subito dopo la nascita oppure insorgere tardivamente ed avere un andamento incostante, caratterizzato dall'alternarsi di miglioramenti e peggioramenti. Essendo legate alla razza, presentano aspetti clinici e microscopici variabili (tab. 5).

La patogenesi delle alopecie ereditarie non è stata ancora ben chiarita. Le varie ipotesi suppongono che alla base della follicolopatia vi sia un difetto primitivo strutturale o nello sviluppo del follicolo pilifero, una difettiva cheratinizzazione, condizionata da fattori enzimatici locali, od un alterato processo di melanizzazione. Il normale trasferimento di melanina può essere inibito da alterazioni nella produzione della melanina, nella sua disposizione all'interno dei melanociti o nel trasferimento ai cheratinociti, od una combinazione di entrambe. Con una primaria o secondaria alterazione nella melanizzazione, le cellule del fusto del pelo possono essere esposte all'effetto citotossico dei precursori della melanina, per cui ne risulta la crescita di un pelo malformato e debole. Il danno poi può essere talmente grave da danneggiare permanentemente il bulbo pilifero.

L'**alopecia da diluizione del colore** colpisce razze di cani con mantello di colore diluito rispetto allo standard di razza ed in special modo Dobermann, Danesi, Yorkshire terriers, ma è riscontrabile anche nelle stesse razze in cani con mantello normale. Il manto è scadente e l'alopecia, che insorge tardivamente, è talvolta limitata solo alle zone in cui è presente il colore "diluito". Tale patologia è associata al *locus d* della diluizione del colore, tuttavia non ne è chiaro in che modo esso ne sia coinvolto. Aspetto caratteristico è la distribuzione irregolare nel fusto del pelo di grossi ammassi di melanina (che al microscopio elettronico consistono in aggregati di macromelanosomi) che deformano la corticale, mentre la midollare può essere meno pigmentata dei peli normali.

Nella ereditaria **displasia follicolare dei peli neri** l'alopecia è localizzata alle aree con pelo scuro o nero in cani con mantello bianco chiazzato di nero. Sebbene i cani alla nascita siano normali e sviluppino tale alterazione tardivamente, essi presentano quadri istologici follicolari alterati già in giovanissima età (3/6 settimane di vita).

L'istologia delle due forme è molto simile, tanto da renderle indistinguibili mediante tale indagine. I melanociti ed i cheratinociti dello strato basale dell'epidermide appaiono ripieni di melanina in grossi aggregati. Analoga pigmentazione appare nelle cellule della matrice del pelo. L'infundibolo pilifero è spesso dilatato, ipercheratotico, talvolta cistico e deforme, e contenente cheratina ed ammassi di melanina. Questa è presente anche nel derma peribulbare libera o fagocitata da melanofagi. I follicoli piliferi sono caratterizzati da atrofia e conformazione distorta, in alcuni casi si ha iperplasia dell'epidermide.

La **displasia follicolare canina** è una sindrome dalla patogenesi poco chiara con forte predisposizione di alcune razze, caratterizzata da scarsa qualità e variazione del colore del pelo, perdita selettiva di peli primari o alopecia completa, in cui si osserva istologicamente un arresto nella fase telogena o catagen dei follicoli piliferi, in associazione con alterazioni di forma del follicolo, atrofia follicolare ed alterazioni della pigmentazione. La displasia follicolare canina insorge caratteristicamente in alcune razze canine (Siberian

Husky, Irish Water Spaniel, Portuguese Water dog, Retriever a pelo riccio, Airedale terrier, Boxer, Bulldog inglese e francese, Schnauzer nani) perciò nello studio di tale patologia occorre conoscere le caratteristiche istologiche normali del follicolo pilifero delle razze in questione, in special modo quelle con pelo riccio.

All'indagine microscopica delle displasie follicolari canine, oltre agli aspetti poco sopra accennati, si osservano follicoli piliferi in fase catagena, con prominenti figure "a fiamma" e membrana basale spessa nella displasia del Siberian Husky, ed aspetti di degenerazione ed apoptosi di cheratinociti della guaina epiteliale esterna, nella displasia dei cani a pelo riccio.

**L'ipotricosi congenita** è una genodermatosi osservabile in alcune razze canine e feline inquadrabile nel gruppo delle displasie ectodermiche ereditarie, caratterizzate da alopecia parziale o totale fin dalla nascita. L'alopecia può essere l'unica manifestazione oppure si associa anche un alterato sviluppo della dentizione, degli annessi oculari o delle unghie. Quando invece tutti gli elementi epiteliali della pelle sono assenti la sindrome si definisce *epiteliogenesis imperfecta*, generalmente letale. Sia le forme localizzate che quelle diffuse sono probabilmente il risultato di un analogo fenomeno genetico; la quasi totalità delle ipotricosi sono dovute ad un gene autosomico recessivo.

La teoria patogenetica più seguita giustifica l'alopecia con la completa mancanza di sviluppo follicolare. Tuttavia la presenza di melanofagi e di tessuto connettivo orientato verticalmente al di sotto alle strutture follicolari rudimentali suffraga l'ipotesi che ad un iniziale sviluppo abbiano fatto seguito fenomeni regressivi od involutivi. Questi potrebbero aver avuto luogo per il mancato incontro della papilla dermica con le cellule staminali follicolari del bulbo.

All'osservazione istologica vi sono i quadri di una displasia follicolare estrema includente la totale mancanza degli annessi pilo-sebacei mentre l'epidermide è normale. Occasionalmente si può rintracciare qualche follicolo rudimentale, simile alla gemma epiteliale che si forma nello sviluppo embrionario del follicolo pilifero, o qualche elemento epiteliale sparso nel derma.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bell A., Oliver F.: Vet Derm., 6, 221, 1995.
2. Bourdeau P.: Rec. Méd. Vét. 166, 665, 1990.
3. Camy G.: Le Point Vét., 20, 49, 1988.
4. Carlotti D.N.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 1, Ed. Tscharnher C.V., Halliwell E.W., Baillière Tindall, London, 43, 1990.
5. Conroy J.D.: Comp. Cont. Ed. Pract. Vet., 1, 806, 1979.
6. Dunstan R.W.: In "Atti del 24° incontro di aggiornamento permanente dei veterinari per animali da compagnia", SCIVAC., 127, 1994.
7. Foil C.S.: In "Hoskins J.D., ed. Veterinary Pediatrics. Saunders W.B., Philadelphia, 359, 1990.
8. Gross T.L., Ihrke P.J.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 1, Ed. Tscharnher C.V., Halliwell R.E.W., Baillière Tindall, London, 77, 1990.
9. Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J.: In "Veterinary dermatopathology: a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease.", Mosby C.V., St Louis 1992.
10. Hargis, A.M., Haupt K.H.: Vet. Annual, 30, 277, 1990.

- 11.Hargis, A.M., Brignac M.M., Kareem Al-Bagdadi F.A., Muggli F., Mundell A.: Vet. Dermatology 2, 69, 1991.
- 12.Ihrke P.J.: In "Atti del 24° incontro di aggiornamento permanente dei veterinari per animali da compagnia", SCIVAC., 73, 1994.
- 13.Ihrke P.J., Mueller R.S., Stannard A.A.: Vet. Derm., 4, 65, 1993.
- 14.Lothrop C.D.: Comp. Cont. Ed. Pract. Vet., 10, 1346, 1988.
- 15.Mechelli L., Barneschi B., Fabbrini F., Lotti U., Schiavi S.: Veterinaria, 7, 5, 1993.
- 16.Medleau L.: J.A.A.H.A., 25, 689, 1989.
- 17.Miller W.H.: Comp. Cont. Ed. Pract. Vet., 12, 461, 1990.
- 18.Miller W.H.: Vet. Derm., 1, 113, 1990.
- 19.Miller W.H.: Vet. Derm., 1, 181, 1990.
- 20.Miller W.H., Scott D.W.: Vet. Derm., 6, 67, 1995.
- 21.Muller G.H., Kirk R.W., Scott D.W. : In "Small animal dermatology". Lippincott J.B., Philadelphia, 1989.
- 22.Muller S.A.: J. Am. Acad. Derm., 23, 56, 1990.
- 23.O'Neil C.S.: Comp. Cont. Ed. Pract. Vet., 3, 791, 1981.
- 24.Parker W.M., Scott D.W.: J.A.A.H.A., 16, 824, 1980.
- 25.Post K., Dignean M.A., Clark E.G.: J.A.A.H.A., 24, 659, 1988.
- 26.Post K., Dignean M.A., Clark E.G.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 1, Ed. Tscharnner C.V., Halliwell R.E.W., Baillière Tindall, London, 446, 1990.
- 27.Prieur D.J., Collier L.L.: J. Heredity, 72, 178, 1981.
- 28.Rojko J.L., Hoover E.A., Martin S.L.: Vet. Pathol., 15, 579, 1978.
- 29.Roperto F., Cerundolo R., Restucci B., Vincensi M.R., De Caprariis D., De Vico G., Maiolino P.: Vet. Derm., 6, 171, 1995.
- 30.Rosser E.J.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 1, Ed. Tscharnner C.V., Halliwell R.E.W., Baillière Tindall, London, 34, 1990.
- 31.Rosychuk R.A.W., Vroom M.W.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 2, Ed. P.J.Ihrke, I.S. Mason, S.D. White, Pergamon Press, Oxford, 403, 1993.
- 32.Scott D.W.: J.A.A.H.A., 18, 173, 1982
- 33.Scott D.W.: Vet. Derm., 1, 37, 1989.
- 34.Scott D.W.: Cornell Vet., 80, 187, 1990.
- 35.Scott D.W.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 1, Ed. Tscharnner C.V., Halliwell R.E.W., Baillière Tindall, London, 3, 1990.
- 36.Scott D.W., Concannon P.W.: J.A.A.H.A., 19, 523, 1983.
- 37.Selmanowitz V.J, Markofsky J., Orentreich N.: J.A.V.M.A., 171, 1079, 1977.
- 38.Stogdale L., Botha W.S., Saunders G.N.: J.A.A.H.A., 18, 184, 1982.
- 39.Thoday K.L.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 1, Ed. Tscharnner C.V., Halliwell R.E.W., Baillière Tindall, London, 47, 1990.
- 40.Thompson M.W.D.: Doberman Quarterly 4, 14, 1987.
- 41.Walder E., Ferrer L.: In "Advances in veterinary dermatology." Vol. 1, Ed. Tscharnner C.V., Halliwell R.E.W., Baillière Tindall, London, 440, 1990.
- 42.White S.D., Ceragioli K.L., Bullock L.P., Mason G.D., Stewart L.J.: Comp. Cont. Ed. Pract. Vet., 11, 446, 1989.

## Patologia del follicolo pilifero (Dunstan, 1994)

### **Malattie associate alla presenza di peli anomali o troppo piccoli**

#### *1. Alopecie cicatriziali*

- Primaria
- Secondaria

#### *2. Alopecie non cicatriziali*

- Distrofie follicolari (Cane cinese crestato)
- Alopecie metaboliche
  - Sistemiche (Ipercorticosurrenalismo, effluvio telogeno)
  - Localizzate (Alopecia universale del Beagle)
- Varie (Dermatosi che rispondono alla castrazione, agli estrogeni, all'ovarioisterectomia, all'ormone della crescita; alopecia stagionale del fianco, ipotiroidismo)
- Anomalie delle cellule della matrice e dei melanociti (Alopecia da diluizione di colore, displasia follicolare dei peli neri.)

### **Malattie associate a peli più numerosi, più lunghi o più ruvidi della norma (ipertricosi)**

1. Irsutismo
2. Ipertricosi localizzata

Tab. 1

# Patologia non infiammatoria del follicolo pilifero (Irhke, 1994)

## Malattie atrofiche

### *1. Endocrinopatie*

- Ipo- e iper- tiroidismo
- Ipercorticosurrenalismo
- Iper- e ipo- estrogenismo
- Femminilizzazione del cane maschio (Sertolioma)
- Dermatosi sensibile alla castrazione
- Iposomatotropismo

### *2. Follicolopatie ischemiche*

- Dermatomiosite familiare del cane
- Alopecia da vaccinazione antirabbica

### *3. Varie*

- Alopecia dopo tosatura
- Effluvio telogeno/anageno
- Alopecia areata
- Alopecia cicatriziale
- Alopecia canina da trazione
- Alopecia psicogena

## Malattie displasiche

- Alopecia da diluizione di colore
- Displasia follicolare dei peli neri
- Displasia follicolare canina
- Alopecia acquisita
- Ipotricosi congenita

Tab. 2

**Aspetti istologici comuni a tutte le endocrinopatie**

- Atrofia, acantosi, epidermide normale
- Ipercheratosi ortocheratotica dell'epidermide
- Iperpigmentazione epidermica
- Ipercheratosi ortocheratotica del follicolo pilifero
- Dilatazione del follicolo pilifero
- Atrofia del follicolo pilifero
- Follicoli piliferi fermi in fase catagena o telogena
- Atrofia delle ghiandole sebacee

Tab. 3

**Alopecie nutrizionali** (Tab. 4)

Carenza	Aspetto clinico	Aspetto istologico
Proteica	Pelo secco, fragile ed opaco Alterazioni della forma e delle dimensioni del pelo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telogenizzazione del follicolo pilifero</li> <li>• Ipercheratosi ortocheratotica</li> <li>• Deformazione della forma del follicolo pilifero e diminuzione del diametro di pelo</li> </ul>
Acidi grassi insaturi	Alopecia Pelo opaco, sottile, secco e fragile Squamosità	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telogenizzazione del follicolo pilifero</li> <li>• Ipercheratosi ortocheratotica</li> </ul>
Vitamina B Biotina, Riboflavina, Acido Pantotenico, Piridossina	Alopecia parziale o diffusa Seborrea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telogenizzazione del follicolo pilifero</li> <li>• Ipercheratosi ortocheratotica</li> <li>• Deformazione della forma del pelo</li> <li>• Emorragie perifollicolari</li> </ul>
Vitamina A (Dermatosi sensibile alla vit.A Coker Spaniels)	Alopecia Seborrea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telogenizzazione del follicolo pilifero</li> <li>• Ipercheratosi ortocheratotica dei follicoli piliferi</li> <li>• Ipercheratosi del dotto delle ghiandole sebacee</li> </ul>
Vitamina E (cane)	Alopecia seborrea secca Dermatite	Dermatite superficiale perivasale iperplastica
Rame	Pelo fragile ed opaco	atrofia dei follicoli piliferi
Zinco	Alopecia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paracheratosi epiteliale e follicolare</li> <li>• Dermatite superficiale perivasale iperplastica</li> </ul>
Iodio	Alopecia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telogenizzazione</li> <li>• Ipoplasia dei follicoli piliferi</li> </ul>

**Alterazioni istologiche variamente espresse nelle patologie displasiche del follicolo pilifero**

- Ipercheratosi dell'epidermide
- Ipercheratosi follicolare infundibolare
- Dilatazione dell'infundibolo pilifero
- Macromelanosomi nell'epitelio follicolare e nella superficie dell'epidermide
- Melanofagi perifollicolari (bulbo pilifero)
- Iperpigmentazione delle ghiandole sebacee
- Ammassi di melanina nel lume follicolare
- Follicoli piliferi atrofici
- Follicoli piliferi in fase telogena
- Follicoli piliferi displasici
- Vacuolizzazione della guaina esterna della radice
- Apoptosi dei cheratinociti delle guaine interna ed esterna della radice

Tab. 5

# PATOLOGIE INFIAMMATORIE DEL FOLLICOLO PILIFERO NEL CANE E NEL GATTO

MEHELLI L.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Perugia*

I processi infiammatori del follicolo pilifero rappresentano una patologia di frequente riscontro nella dermatologia del cane e del gatto. In queste specie animali, infatti, sulla base della nostra personale esperienza e dei dati disponibili in letteratura, questi processi infiammatori costituiscono circa il 40% di tutte le flogosi diagnosticabili a livello cutaneo (3, 4, 7, 9).

Oltre ad essere bersaglio di patologie primarie, le unità follicolari pilifere sono spesso coinvolte da eventi secondari, quali conseguenze di malattie cutanee di varia natura (4,9). Queste flogosi secondarie sono più frequentemente associate a dermatopatie pruriginose, a processi abnormi di cheratinizzazione e corneificazione, a disendocrinie, così come a stati di immunodeficienza (2, 8).

Gli agenti causali coinvolti nella eziopatogenesi dei processi infiammatori follicolari, che da questo momento ed in questo preciso contesto potremmo per brevità indicare con il termine di "follicoliti", sono numerosi. Tra questi devono essere ricordati i batteri, i miceti, i lieviti, i parassiti, alcuni agenti fisici ed anche alcune sostanze farmacologiche (2, 6).

Riteniamo utile chiarire quali sono stati i criteri di classificazione da noi adottati al fine di meglio inquadrare ed interpretare la complessa varietà dei quadri anatomo-istopatologici osservati, creando così i presupposti per una corretta interpretazione eziopatogenetica. I nostri criteri si ricollegano ai ben noti modelli istopatologici proposti da Ackerman (1), nel 1978, per la dermatologia umana, che permettono di classificare le patologie infiammatorie del follicolo pilifero in tre gruppi maggiori e cioè: perifollicoliti, follicoliti e foruncolosi.

Con il termine di perifollicolite si intendono le flogosi contraddistinte dalla presenza di un essudato cellulare, prevalentemente di tipo linfo-monocitario, all'intorno della struttura follicolare pilifera. Poiché questo termine è impropriamente utilizzato per descrivere anche le dermatopatie perivasali superficiali, riteniamo opportuno individuare ancora un modello "minore" di riferimento, la follicolite murale, nel quale la parete del follicolo rappresenta la sede ed il bersaglio principale del processo patologico (9).

Le follicoliti, differenziabili in superficiali e profonde, sottintendono l'accumulo di cellule infiammatorie, prevalentemente granulociti polimorfonucleati, all'interno del lume follicolare.

Le foruncolosi, infine, individuano quel particolare evento patologico che si caratterizza per la rottura della parete del follicolo pilifero e la dispersione del materiale contenuto all'interno, quale cheratina, peli, et altro, nel derma circostante. Questo evento provoca l'insorgenza di una intensa ed estesa reazione infiammatoria dermica di natura granulomatosa e/o piogranulomatosa.

Sebbene queste entità isto-patologiche "maggiori" possano rappresentare un *continuum*, e cioè essere l'una conseguenza dell'altra, non vi è dubbio che le

singole entità morbose possano insorgere e mantenersi come tali, per periodi di tempo più o meno lunghi (9).

Un altro criterio di classificazione, più articolato e significativo e che abbiamo tenuto ben presente nel nostro studio, è quello proposto, nel 1992, da Thelma Lee Gross (3), che individua i meccanismi eziopatogenetici coinvolti nello sviluppo delle lesioni infiammatorie follicolari.

Questo criterio consente di distinguere due gruppi fondamentali di malattie e cioè:

- 1) malattie pustolose e nodulari senza distruzione del follicolo pilifero;
- 2) malattie pustolose e nodulari con distruzione del follicolo pilifero.

Delimitare in modo netto, sulla base del semplice esame morfologico, le dermatopatie del primo gruppo da quelle del secondo non è sempre facile, a motivo della concomitanza e della gravità degli eventi patologici che le contraddistinguono.

In generale, tuttavia, le dermatopatie incluse nel primo gruppo si caratterizzano per una più contenuta espressione del fenomeno flogistico e per una più costante localizzazione superficiale a livello cutaneo. Per queste patologie l'esame morfologico consente bene spesso di individuare la presenza dell'agente patogeno (ad es. dermatofiti), o di evidenziare un aspetto istopatologico particolare (come l'acantolisi primaria nel pemphigus foliaceus), o di rilevare una particolare e prevalente componente cellulare dell'essudato infiammatorio (come nella pustolosi eosinofila sterile) (3, 8).

Le malattie del secondo gruppo si caratterizzano per una flogosi pustolosa che conduce inevitabilmente alla rottura dell'integrità morfo-funzionale del follicolo pilifero, con conseguenti fenomeni piogranulomatosi profondi. Queste patologie possono essere sostenute da agenti evidenziabili istologicamente (demodex, dermatofiti, ecc.) o da agenti difficilmente rilevabili all'esame microscopico (follicoliti batteriche profonde, foruncolosi, ecc.). Inoltre, appartengono a questo gruppo tutte quelle patologie che conducono alla rottura della parete follicolare, provocate, nella maggioranza dei casi, da un eccessivo accumulo di cheratina all'interno (callosità, acne, comedoni, ecc.) (3,6).

Ciò premesso, abbiamo ritenuto opportuno riferire le conoscenze fino ad oggi acquisite su questo specifico tema di dermatologia in forma sintetica, avvalendoci dei così preziosi criteri di classificazione sopra ricordati. Dobbiamo altresì ricordare che questo nostro contributo al XVI Convegno Nazionale A.P.I.V. è stato preceduto da un'ampia relazione sulla struttura e funzione dell'unità follicolare pilifera degli animali domestici, presentata dal Dott. Leonardo Della Salda, dell'Università di Bologna.

Per quanto riguarda i temi di dermatopatologia presi in considerazione e per la relativa terminologia utilizzata si rimanda al testo di Anatomia Patologica Veterinaria di F. Guarda e G. Mandelli (5) e a quello di R. G. Thomson (10).

## **1) MALATTIE PUSTOLOSE E NODULARI SENZA DISTRUZIONE DEL FOLLICOLO PILIFERO**

### **FOLLICOLITE BATTERICA SUPERFICIALE**

Eziologia: *Staphylococcus intermedius*

Specie colpita: cane e gatto (raramente)

Fattori predisponenti: prurito, seborrea, disendocrinie, immunodepressione

Lesioni principali: pustola follicolare

Dermatopatologia: pustole infundibulari contenenti granulociti neutrofili e/o eosinofili; l'essudato cellulare può raggiungere l'istmo; infiltrati perifollicolari dermici superficiali di polimorfonucleati e mononucleati.

Diagnosi differenziali: piodermite batterica superficiale, follicolite eosinofila sterile

### **DERMATOFITOSI**

Eziologia: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*

Specie colpita: cane e gatto

Razze predisposte: Dalmata e Barboncino (cane); Persiano (gatto)

Fattori predisponenti: stati di immunodepressione, disendocrinie, FIV e FeLV (gatto)

Lesioni principali: alopecia, papule, pustole

Dermatopatologia: perifollicoliti; follicoliti; colonizzazione dei segmenti di pelo intrafollicolare con il rilievo di ife e spore.

Diagnosi differenziali: demodicosi, follicolite batterica superficiale, alopecia areata

### **PEMPHIGUS FOLIACEUS**

Eziologia: malattia autoimmune bollosa cutanea caratterizzata dalla produzione di anticorpi anti-desmosomi.

Specie colpita: cane e gatto

Razze predisposte: Collie, Akita, Chow-Chow, Doberman

Lesioni principali: vescicole, bolle e pustole

Localizzazioni comuni: lesioni simmetriche facciali, auricolari ed ai cuscinetti plantari

Dermatopatologia: pustole subcorneali infundibulari contenenti numerosi cheratinociti acantolitici; depositi di Immunoglobuline G negli spazi intercellulari delle porzioni superficiali dei follicoli piliferi e della epidermide.

Diagnosi differenziali: follicolite batterica profonda, *Pemphigus vegetans*

### **ADENITE SEBACEA**

Eziologia: incerta (genodermatosi, autoimmunità)

Specie colpita: cane e gatto

Razze predisposte: Barboncino, Akita, Vizsla, Samoyedo

Lesioni principali: alopecie, scaglie e casts follicolari di cheratina

Dermatopatologia: ipercheratosi; cheratosi follicolare; adenite granulomatosa sebacea con istiociti, granulociti neutrofili e linfociti; fibrosi perighiandolare.  
Diagnosi differenziali: granulomatosi sterile; piogranulomatosi; istiocitosi; leishmaniosi; demodicosi

## **2) MALATTIE PUSTOLOSE E NODULARI CON DISTRUZIONE DEL FOLLICOLO PILIFERO**

### **FOLLICOLITE BATTERICA PROFONDA e FORUNCOLOSI**

Eziologia: Staphylococcus intermedius; Proteus sp.; Pseudomonas sp.; E.coli

Specie colpita: cane

Razze predisposte: soggetti a mantello lungo

Fattori predisponenti: follicoliti superficiali; demodicosi; disendocrinie; immunodepressione

Lesioni principali: noduli, fistole, bolle emorragiche, ulcere

Dermatopatologia: follicolite; foruncolosi; dermatite diffusa con lesioni nodulari piogranulomatosi con predominanza di granulociti neutrofili, istiociti e plasmacellule.

Diagnosi differenziali: kerion; demodicosi; dermatite dei calli; acne

### **DERMATITE DEI CALLI**

Eziologia: rottura traumatica di follicoli piliferi ispessiti e dilatati

Specie colpita: cane

Razza predisposte: taglie grandi

Fattori predisponenti: sviluppo di callosità

Lesioni principali: eritemi; fistole; ulcerazioni

Dermatopatologia: intensa acantosi epidermica e follicolare; ulcerazione e necrosi superficiale; rottura di cisti follicolari con sviluppo di processi suppurativi e piogranulomatosi superficiali e profondi; tricogranulomi e fibrosi dermica.

Diagnosi differenziali: dermatite da leccamento; acne

### **ACNE**

Eziologia: sviluppo di comedoni a livello del mento e labbra per attivazione ormonale delle ghiandole sebacee in età puberale

Specie colpita : cane e gatto

Razze predisposte: soggetti a mantello corto

Fattori predisponenti: età puberale

Lesioni principali: comedoni, papule, pustole, noduli, foruncoli e fistole su mento e labbra

Dermatopatologia: cheratosi follicolare; follicolite; foruncolosi e piogranulomatosi profonda

Diagnosi differenziali: dermatite dei calli; kerion; lebbra felina

### **KERION**

Eziologia: numerose famiglie di dermatofiti su cui prevale la presenza del Microsporium gypseum

Specie colpita: cane

Razze predisposte: Boxer, Golden Retriever

Fattori predisponenti: condizioni di ipersensibilità nei confronti del dermatofita

Lesioni principali: alopecia; eritemi; noduli; fistole

Dermatopatologia: foruncoli con estesi fenomeni piogranulomatosi caratterizzati dalla presenza di macrofagi, granulociti neutrofili e cellule giganti; frammenti di peli imprigionati all'interno dei granulomi possono contenere spore o ife di dermatofiti.

Diagnosi differenziali: follicolite batterica profonda; foruncolosi

### **DEMODICOSI**

Eziologia: Demodex sp.

Specie colpita: cane e gatto

Razze predisposte: soggetti a mantello corto

Fattori predisponenti: alterazioni del sistema immunitario di origine ereditaria, iatrogena, disendocrina, virale, neoplastica

Distribuzione delle lesioni: due forme cliniche fondamentali (localizzate e diffuse)

Lesioni principali: variano in relazione alla forma clinica (macule, papule, pustole, eritemi, scaglie, noduli, foruncoli)

Dermatopatologia: follicolite murale, perifollicolite, follicolite, foruncolosi, dermatite nodulare

Diagnosi differenziali: follicolite batterica; follicolite micotica; adenite sebacea; acne

### **FORUNCOLOSI EOSINOFILICA FACCIALE**

Eziologia: ipersensibilità a punture di insetti

Specie colpita: cane e gatto

Razze predisposte: taglie grandi (cane) e soggetti giovani

Distribuzione delle lesioni: localizzazioni simmetriche al dorso del muso

Lesioni principali: eritemi, papule emorragiche, pustole, noduli, ulcere

Dermatopatologia: perfollicolite, follicolite e foruncolosi con prevalente presenza di granulociti, eosinofili; collagenolisi e degranulazione eosinofila.

Diagnosi differenziale: follicolite batterica profonda; foruncolosi

## **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

Questo breve studio sulle patologie infiammatorie del follicolo pilifero consente alcune considerazioni generali sui compiti che il patologo veterinario svolge nel campo della dermatologia veterinaria e sui rapporti che lo legano alla medicina clinica.

L'uso di tecniche bioptiche semplici e di facile applicazione ha notevolmente accresciuto la nostra conoscenza sulle dermatopatie istologicamente diagnosticabili. Inoltre, poichè la dermatologia moderna è sempre più interessata a soddisfare la domanda "come è accaduto?" piuttosto che "come può essere curato?" (1), il dermatopatologo è chiamato a svolgere, attraverso l'interpretazione delle lesioni microscopiche, un ruolo fondamentale nello studio

dei meccanismi eziopatogenetici coinvolti nel determinismo delle malattie cutanee .

Per poter correttamente utilizzare i criteri di classificazione in dettaglio riferiti, tuttavia, è necessario osservare alcune regole fondamentali che delineano, in maniera inequivocabile, le modalità di collaborazione che possono e devono intercorrere fra dermatologo e dermatopatologo, e cioè : a) la conoscenza di precise e sufficienti notizie anamnestico-cliniche del caso in esame; b) la rappresentatività del campione bioptico rispetto alla patologia in corso; c) l'utilizzo di criteri idonei nel prelievo e nella conservazione dei campioni bioptici; d) la conoscenza sulla variabilità strutturale cutanea nelle varie specie, razze e regioni anatomiche degli animali domestici; e) una approfondita conoscenza della patologia dermatologica veterinaria.

### **SUMMARY**

Cutaneous diseases with follicular inflammation are common in canine and feline dermatology. Their incidence is almost 40% of all cutaneous inflammatory diseases.

The knowledge of these data are connected with the increasing use of skin biopsy and qualified cooperation between clinicians and pathologists. This collaboration allowed us to utilize the method by pattern analysis of the follicular lesions (perifolliculitis, folliculitis, mural folliculitis and furunculosis) in morphological approach to the histological diagnosis. Moreover, it have been used a further histopathological grading that considered the etiopathological mechanisms involved in the development of follicular lesions, that is pustular and nodular diseases without follicular destruction, and pustular and nodular diseases with follicular destruction.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Ackerman A. B.- Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases, Lea & Febinger, Philadelphia (1978)
2. Philadelphia (1978)
3. Dunstan R.W.- Controversies in Veterinary Dermatology, European School for Advanced Veterinary Studies, Kreuznach (1992)
4. Veterinary Studies, Kreuznach (1992)
5. Gross Lee T. et Al.- Veterinary Dermatopathology, Mosby Year Book, St.Louis (1992)
6. Gross Lee T. - Workshop on Veterinary Dermatopathology, E.S.V.D., Royal Veterinary College, Hatfield, England (1987)
7. College, Hatfield, England (1987)
8. Guarda F. e Mandelli G. - Trattato di Anatomia Patologica Veterinaria, UTET - Torino, 2<sup>a</sup> Edizione (1996)
9. Edizione (1996)
10. Jubb K.V. et Al - Pathology of Domestic Animals, Academic Press, San Diego - California
- 11.
12. Kummel B.A. - Color Atlas of Small Animal Dermatology, Mosby Company, St. Louis

- 13.
14. Loyd D. and Halliwell R. - , Course Note in Veterinary Dermatology, European School for
15. Advanced Veterinary Studies, Centre Universitaire de Luxembourg - Ville (1992)
16. Scott D.W. et Al.- Small Animal Dermatology, Saunders Company, 5th Edition,
17. Philadelphia (1995)
18. Thomson R.G. - Special Veterinary Pathology, B.C.Decker Inc., Toronto (1988)

# COLOUR DILUTION ALOPECIA (CDA) NEL CANE.

MAIOLINO P.

*Dipartimento di Patologia, di Profilassi e di Ispezione degli Alimenti  
Sezione di Anatomia Patologica  
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli studi "Federico II" - Napoli*

Colour dilution alopecia (CDA) è una malattia ereditaria caratterizzata da progressiva alopecia in cani con colore "diluito" del mantello ( Austin 1975 e 1979, O'Neill 1981, Briggs e coll. 1986, Brignac e coll. 1988, Ferrer et al.1988, Muller et al.1989, Carlotti 1990, Miller 1990 e 1991, Guaguere 1991 e 1991a, Hargis e coll. 1991, Mechelli 1993).

L'alopecia insorge, generalmente tra i 6 e i 12 mesi di età, nella regione del dorso e dei fianchi per poi estendersi a tutte le aree con colore diluito. Nella sezione di Anatomia Patologica di Napoli abbiamo studiato tale malattia in 10 yorkshire terriers di età compresa tra i 3 mesi e i 10 anni . Il quadro istologico risulta caratterizzato da ammassi di pigmento melaninico nelle cellule dello strato basale della cute , nelle cellule della matrice, nel bulbo, frammenti a cheratina e lungo tutto il fusto del pelo.

Al microscopio elettronico a trasmissione numerose cellule dello strato basale dell'epidermide risultano infarcite di melanosomi maturi e ancora integri. Molte di queste cellule, a conferma della loro origine epiteliale, hanno rapporti di continuità intercellulare grazie alla presenza di desmosomi e sono ancorate alla lamina basale mediante emidesmosomi. Un'anomala presenza di melanosomi maturi e ancora integri è inoltre osservabile tra le lamelle cornee e all'interno delle lamelle degli strati più superficiali in via di desquamazione, espressione verosimilmente di una incapacità dei cheratinociti di metabolizzare questo pigmento. Alcune cellule epidermiche cheratinizzate mostrano discontinuità del "cornified cell envelope".

L'esame dei peli bleu, prelevati dalle regioni nel corso della alopecia, permette di evidenziare, con il microscopio elettronico a scansione, dei rigonfiamenti superficiali che, al microscopio elettronico a trasmissione, appaiono essere costituiti da accumuli di melanina. Tali rigonfiamenti , talvolta, raggiungono dimensioni tali da indurre una deformazione del profilo della cuticola la quale , ad un certo punto di sollecitazione, cede e determina la formazione di profondi crateri. All'interno di questi, grazie all'ausilio della microanalisi a raggi X, è stato possibile mettere in evidenza la presenza di elevati picchi di  $Ca^{++}$  puro.

Abbiamo avanzato una nuova ipotesi sui meccanismi patogenetici responsabili della caduta del pelo in corso di CDA e nella quale il  $Ca^{++}$  sembra avere un ruolo di primaria importanza (Roperto e coll. 1995), che scaturisce dalle lesioni ultrastrutturali osservate.

Il  $Ca^{++}$ , infatti, è essenziale per l'attivazione della protein-chinasi C, coinvolta nella degradazione del materiale fagocitato e nel processo di epitelizzazione (

Nishizuka, 1986) e per la normale attività delle transglutaminasi, che giocano un ruolo centrale nella formazione del "cornified cell envelope" (Hohl, 1990).

#### SUMMARY

Colour dilution alopecia (CDA) is an inherited ectodermal defect characterized by a tardive alopecia in the colour diluted areas of some dogs, with onset between 6 and 12 months of age.

Histologically, melanin clumps were evident in the epidermal basal layer cells as well as inside the bulb and hair shaft.

Ultrastructurally, basal keratinocytes were overloaded by melanosomes. Intracytoplasmatic e free melanosomes were also evident in the all epidermal layers. Some not fully keratinized cells with a discontinuous cornified cell envelop were also evident. Scanning electron microscopical showed holes and bulges scattered in the hair shaft.

X-Ray microanalysis detected unexpected elevated peaks of pure  $Ca^{++}$  in the deepest holes. These observations allow the Authors to make a new hypothesis on the pathogenetic mechanism(s) of alopecia and which the  $Ca^{++}$  seems to plays an important role. In fact, the  $Ca^{++}$  is essential for the activation of protein kinase C,involved in the degradation of phagocytosed material and in the epithelialization process, and of the transglutaminases that play a central role in the cornified cell envelope formation.

#### BIBLIOGRAFIA -

1. Austin V.H.:Modern Veterinary Practice 36,31-34,1975.
2. Austin V.H.:Modern Veterinary Practice 60,130-134,1979.
3. Briggs O.M., Botha W.S.:J.Amer.Anim.Hosp.Assn.22,611-614,1986.
4. Brignac M.M.,Foil C.S.,Al- Bagdadi F.A.K.,Kreeger J.:Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology and the American College of Veterinary Dermatology.Washington 1988.
5. Carlotti D.N.: Advances in Veterinary Dermatology 1,43-46,1990.
6. Ferrer L.,Dural I.,Closa J.,Mascort J.:Veterinary Record 122,360-361,1988.
7. Guaguere E.:Pratique Medicale et Chirurgicale de l'animal de compagnie 26,537-546,1991.
8. Guaguere E. Janin A., Secchi A.: 8th Annual Meeting European Society Dermatology 1991a.
9. Hargis A.M.,Brignac M.M., Al-Bagdadi F.A.K.,Muggli F.,Mundell A.: Veterinary Dermatology 2,69-83,1991. -Hohl D.: Dermatologica 180, 201-211, 1990.
- 10.Mechelli L.,Barneschi B.,Fabbrini F.,Lotti U.,Schiavi S.:Veterinaria 1,5-9,1993.
- 11.Miller W.H.:Veterinary Dermatology 1,113-122,1990.
- 12.Miller W.H.:J.Amer.Anim.Hosp.Assn.27,39-43,1991.
- 13.Muller G.H.,Kirk R.W.,Scott D.W.:Small animal dermatology.Saunders,IV ed.,1989. -Nishizuka Y.: Science. 233, 305-311, 1986.
- 14.O'Neill C.S.: Comp.Cont.Educ.Pract.Vet. 3,791-800,1981.
- 15.Roperto F., Cerundolo R., Restucci B., Vincensi M.R., De Caprariis D., De Vico G., Maiolino P.: Veterinary Dermatology, 6, 171-178,1995.

# CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DEL PILOMATRICOMA NEL CANE: INDAGINE SU 45 CASI.

CARAMELLI M., CASALONE C.\*, CASTAGNARO M.\*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, e  
\*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria,  
Università degli Studi di Torino.*

## INTRODUZIONE

Il pilomatricoma (PM) è una neoplasia cutanea che origina presumibilmente dalle cellule della matrice del pelo. L'incidenza nel cane viene segnalata intorno al 3%<sup>1,2</sup>, colpendo indifferentemente maschi e femmine attorno al sesto anno di età, con una prevalenza per alcune razze quali il Kerry blue terrier, il barbone e lo schnauzer, nelle quali la presenza di un mantello a crescita continua richiede un maggior numero di follicoli piliferi mitoticamente attivi<sup>3</sup>. Il PM del cane viene considerato dalla maggior parte degli Autori una neoplasia benigna e non recidivante<sup>1,2,3,4</sup>. Tuttavia sia nel cane che nell'uomo vengono segnalati casi di PM con metastasi linfonodali e ad altri organi<sup>5,6,7</sup>.

Allo scopo di meglio chiarire le caratteristiche clinico-patologiche del PM del cane, presentiamo i risultati ottenuti da uno studio condotto su 45 cani con PM.

## MATERIALE E METODI

L'indagine è stata effettuata su 45 PM asportati chirurgicamente a cani di diversa razza, sesso e di età compresa tra i 2 e i 13 anni. Nei casi dove veniva segnalata, la sede della lesione appariva variamente distribuita, con prevalenza della localizzazione toracica (Tab.1). Sezioni di ogni tumore sono state fissate con formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina e colorate con le comuni colorazioni per l'istologia. Allo scopo di valutare l'espressione della citocheratine è stata inoltre eseguita una metodica immunoistochimica con un cocktail di anticorpi monoclonali anticitocheratine 22- 68 kd (Bioptica, Milano). Ogni animale è stato seguito clinicamente dal veterinario curante per un anno a partire dal momento dell'escissione chirurgica.

## RISULTATI

Le lesioni, solitamente riferite come uniche, apparivano di aspetto emisferico o a piastra rilevata, di consistenza soda, ben delimitate dal tessuto circostante, mentre la cute sovrastante risultava spesso alopecica, talora ulcerata.

Il quadro istopatologico era pressoché sovrapponibile in tutti i tumori, con proliferazione in quantità variabile di cellule basofile, di natura basaloide, caratterizzate da scarso citoplasma e nuclei di aspetto vescicoloso, solitamente ovoidali; i nucleoli piccoli, l'attività mitotica elevata, ma senza marcate atipie (Fig.1). Situate prevalentemente all'interno delle isole basaloide, si apprezzavano

costantemente larghi fogli di cellule “ombra” o “fantasma”, caratterizzate da una debole eosinofilia e da nucleo centrale non colorato, con contorni cellulari facilmente individuabili. Tali cellule andavano progressivamente incontro a fenomeni regressivi di tipo litico, con perdita progressiva dei dettagli morfologici e formazione di una massa amorfa relativamente omogenea. Piccoli focolai rotondi di cheratinizzazione potevano essere notati sia all'interno delle masse di cellule ombra che frammisti alla popolazione di cellule basali. Occasionalmente si poteva apprezzare una modesta melanizzazione. Lo stroma appariva costituito da tessuto fibroso denso, frequentemente infiltrato da cellule infiammatorie prevalentemente mononucleate, spesso con cellule giganti da corpo estraneo, come risposta alla liberazione di materiale cheratinizzato fuoriuscito per la rottura delle formazioni cistiche. I cordoni o le masse di cellule neoplastiche si presentavano sempre nettamente separate dall'epidermide sovrastante.

La colorazione immunoistochimica ha permesso di evidenziare una spiccata positività per le cellule cheratinizzate, in modo particolare per quelle site all'interno degli agglomerati di cellule basali. Tale positività andava sfumando verso il centro della lesione mentre mancava completamente a carico delle cellule di tipo basaloide (Fig. 2).

Il decorso post-chirurgico degli animali con PM è risultato privo di recidive o diffusionsi metastatiche in tutti i casi, ad eccezione di un cane di razza grifone, maschio, di due anni di età, al quale era stato prelevato un PM in sede scapolare. Tre mesi dopo il primo intervento, l'animale è stato nuovamente sottoposto ad asportazione chirurgica di un nodulo ascellare delle dimensioni di una noce.

Istologicamente la neoformazione risultava costituita da una proliferazione neoplastica, con caratteristiche sovrapponibili a quelle osservate nella massa scapolare, la quale invadeva diffusamente un struttura linfonodale (Fig. 3). Sei mesi dopo questo secondo intervento, il cane iniziò a presentare una sintomatologia respiratoria imponente refrattaria a qualsiasi terapia. L'esame radiologico permise di mettere in evidenza la presenza di metastasi disseminate ai lobi anteriori del polmone. Il progressivo peggioramento delle condizioni generali dell'animale spinse il proprietario a richiedere l'eutanasia a cui non fu possibile far seguire l'esame necroscopico.

## DISCUSSIONE

Le caratteristiche clinico-patologiche del PM rilevate nella nostra casistica quali l'età di insorgenza, la localizzazione e le peculiarità istopatologiche sono sostanzialmente sovrapponibili a quanto riportato in altri lavori<sup>1,2,3</sup>.

Sia nell'uomo che negli animali il PM viene considerato una neoplasia benigna. Le nostre osservazioni su 45 casi esaminati nel corso di tre anni confermano una evoluzione benigna del PM nella maggior parte dei casi.

Tuttavia nella valutazione prognostica del PM occorre tener presente la possibilità, anche se rara, di una sua progressione maligna. Nella casistica da noi osservata, solamente uno dei casi ha presentato una evoluzione maligna con metastasi clinicamente rilevate al polmone sovrapponibile a quanto descritto in letteratura in un altro cane<sup>6</sup>. L'esame istopatologico ed immunoistochimico di

questo PM maligno non ha permesso di evidenziarne caratteristiche morfologiche tali da formulare una prognosi diversa rispetto ai casi rimanenti.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Weiss E. e Frese K.: Tumours of the skin. Bull. WHO, 50, 79-100, 1974.
2. Muller G.H., Kirk R.W. e Scott D.W.: Dermatologia Veterinaria dei Piccoli Animali. UTET, 1994.
3. Walder E.J. e Gross T.L.: Neoplastic diseases of the skin. In: Veterinary dermatopathology. A macroscopic and microscopic evaluation of the canine and feline skin disease. Ed. Gross T.L., Ihrke P.J. e Walder E.J., Mosby Year Book, Londra, 365-367, 1992.
4. Nielsen S.W. e Cole C.R.: Cutaneous epithelial neoplasms of the dog. A report of 153 cases. Am.J.Vet.Res., 21, 931-948, 1960.
5. Sells D.M. e Conroy J.D.: Malignant epithelial neoplasia with hair follicle differentiation in dogs. Malignant pilomatrixoma. J.Comp.Path., 86, 121-129, 1976.
6. Johnson R.P., Johnson J.A., Groom S.C. e Burgess L.: Malignant pilomatrixoma in an Old english sheepdog. Can.Vet.J., 24, 392-394, 1983.
7. Monchy D., McCarthy S.W. e Dubourdieu D.: Malignant pilomatixoma of the scalp. Pathology, 27, 201-203, 1995.

Tabella 1. Nella tabella vengono riassunti i dati relativi a razza, sesso, età, localizzazione e follow-up dei cani con PM.

<b>Razza</b>	<b>Sesso</b>	<b>Età (anni)</b>	<b>Localizzazione cutanea</b>	<b>Follow-up</b>
1. Maremmano	m	10	Arto	+
2. Pastore tedesco	f	11	Anca	+
3. Pastore tedesco	m	10	Sterno	+
4. Meticcio	f	10	Coda	+
5. Setter	f	11	N.D.	+
6. Meticcio	f	5	Collo	+
7. Schnauzer	f	10	Costato	+
8. Meticcio	f	8	Addome	+
9. Terrier	m	2	Arto	+
10. Pastore tedesco	f	5	Lombare	+
11. Meticcio	f	6	Collo	+
12. Meticcio	f	3	N.D.	+
13. S. Bernardo	f	7	N.D.	+
14. Pastore tedesco	m	4	N.D.	+
15. Pastore tedesco	m	6	N.D.	+
16. Meticcio	m	4	N.D.	+
17. Yorkshire	m	5	N.D.	+
18. Pastore tedesco	f	4	N.D.	+
19. Meticcio	m	4	N.D.	+
20. Meticcio	f	9	N.D.	+
21. Schnauzer	m	7	N.D.	+
22. Schnauzer	f	10	N.D.	+
23. Spinone	m	4	N.D.	+
24. Bracco	m	12	N.D.	+
25. Mastino Napoletano	f	5	N.D.	+
26. Boxer	m	5	N.D.	+
27. Schnauzer	m	7	N.D.	+
28. Meticcio	f	8	N.D.	+
29. Grifone	m	2	Spalla	Deceduto
30. Schnauzer	m	8	Spalla	+
31. Meticcio	m	6	N.D.	+
32. Pastore tedesco	f	8	N.D.	+
33. Barbone	f	7	Spalla	+
34. Meticcio	f	8	Torace	+
35. Pastore tedesco	m	10	N.D.	+
36. Terrier	m	8	Dorsale	+
37. Setter	m	4	N.D.	+
38. Schnauzer	f	10	N.D.	+
39. Spinone	m	10	N.D.	+
40. Pastore tedesco	f	8	Spalla	+
41. Meticcio	m	9	Torace	+
42. Bracco	m	10	N.D.	+
43. Meticcio	m	11	Lombare	+
44. Yorkshire	m	13	N.D.	+
45. Meticcio	f	2	N.D.	+

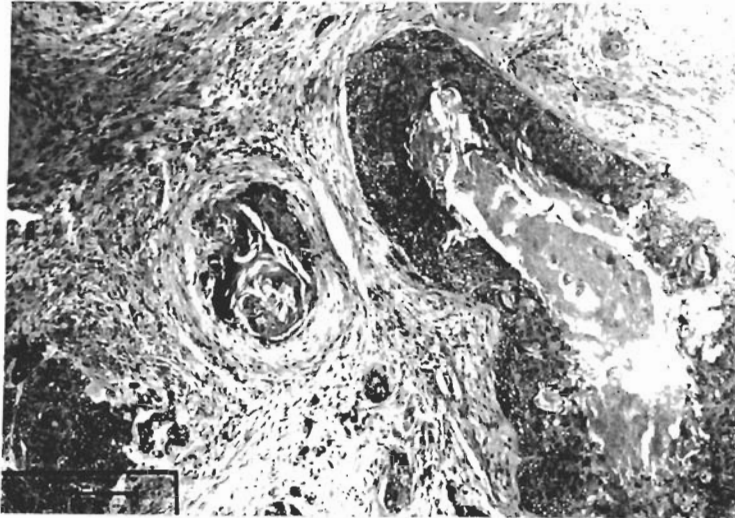


Fig. 1. Nella microfotografia si osserva la tipica architettura del pilomatricoma caratterizzata da isole di cellule basaloide che circondano aree di cellule fantasma. E.E., barra = 100  $\mu$ m.

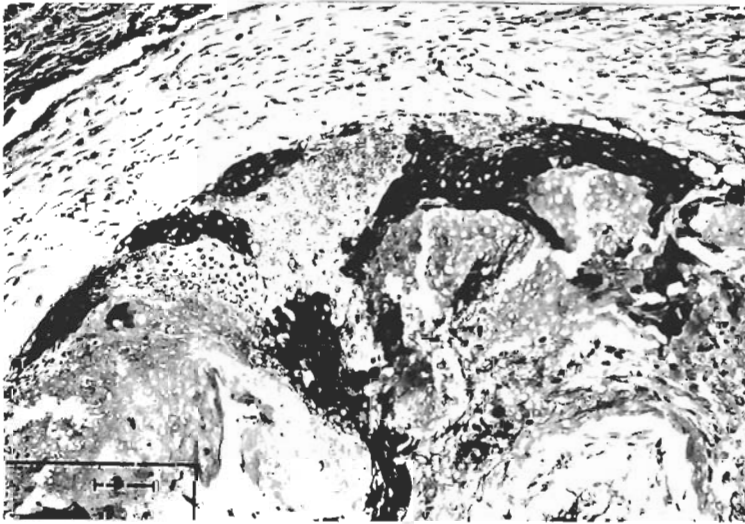


Fig. 2. La reazione immunostochimica per l'espressione delle citocheratine presenta una reazione positiva accentuata per le cellule in differenziazione squamosa, tenue per le cellule fantasma e negativa per le cellule basaloide. Siero anticitocheratine, ABC, barra = 100  $\mu$ m.

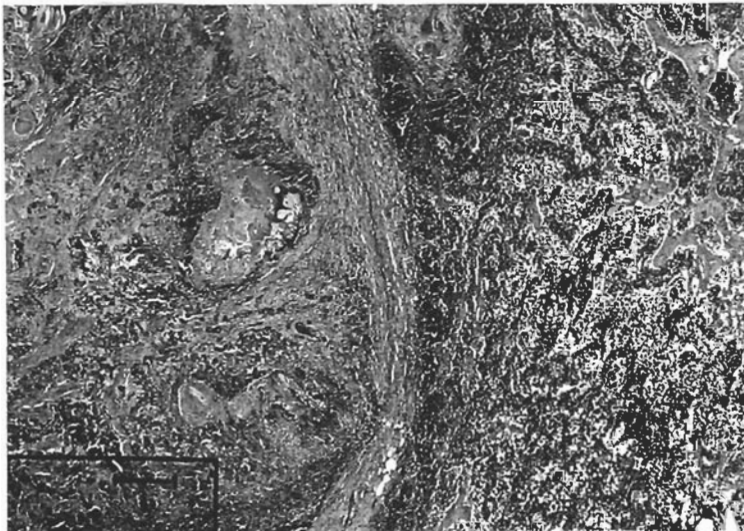


Fig. 3. Nella microfotografia si apprezza la metastasi linfonodale di un pilomatricoma (caso n. 29). E.E., barra = 200  $\mu$ m.

# VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA DELL'ESPRESSIONE DI CADERINA E IN CARCINOMI SQUAMOSI, CARCINOMI BASOSQUAMOSI E BASALIOMI CUTANEI DI CANE.

RICCABONI P., SIRONI G.

## INTRODUZIONE

Le caderine sono una grande classe di glicoproteine transmembrana coinvolte nell'adesione fra cellule omologhe; sono quindi elementi essenziali per la costituzione ed il mantenimento della corretta architettura dei tessuti. Per la loro specificità tissutale vengono suddivise in numerose sottoclassi; fra le principali vanno ricordate le caderine placentari (P Cad), quelle neurali (N Cad) e quelle epiteliali (E Cad) (Takeichi, 1991). L'interesse per queste proteine nello studio della patologia tumorale nasce dal fatto che, sia la capacità infiltrante che quella metastatizzante di un tumore, necessitano della "fuga" di alcune cellule dalla neoplasia primitiva e perché ciò possa verificarsi è necessario che vengano vanificati, almeno parzialmente, i sistemi di adesione intercellulari. *In vitro* l'assenza o l'inattivazione della caderina E è in grado di determinare una sdifferenziazione di cellule epiteliali normali che acquistano un fenotipo indifferenziato ed invasivo (Frixen *et al.*, 1991). Inoltre, studi clinico patologici in campo umano dimostrano che in numerosi carcinomi di varia origine l'espressione di caderina E appare ridotta o, talvolta, persino scomparsa (Birchmeir e Beherens, 1994).

Nel presente lavoro abbiamo studiato l'espressione di Caderina E in carcinomi squamosi, carcinomi basosquamosi e basaliomi cutanei di cane.

## MATERIALI E METODI

Per il presente studio sono stati esaminati campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina di carcinomi squamosi (17 casi), carcinomi basosquamosi (3 casi) e basaliomi (11 casi) cutanei di cane, tutti provenienti dal materiale biptico giunto all'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano negli anni 1994-95. Questi campioni vennero selezionati da una casistica più ampia sulla base della presenza ed immunoreattività, al loro interno, di strutture epiteliali normali come epidermide ed annessi cutanei, quindi considerati controllo positivo interno. L'indagine fu svolta utilizzando la tecnica immunistochemica Avidina-biotina perossidasi (ABC) associata a smascheramento antigenico in soluzione di tripsina (0,1%) e calcio cloruro (0,1%) a pH 7,8 per 15 minuti alla temperatura di 37°C; impiegando l'anticorpo DECMA 1 (Sigma, St. Luis, Missouri), anticorpo monoclonale di ratto anti Caderina E di topo, *cross*-reattivo con la Caderina E del cane (Vestweber e Kemler, 1985).

La valutazione dell'immunoreazione fu eseguita come descritto da Shiozaki *et al.* (1991) definendo E-CD + quei campioni in cui la positività espressa dalle

cellule neoplastiche era paragonabile, per intensità e distribuzione, alla positività dei controlli positivi interni; E-CD +/- quando si manifestava una riduzione dell'intensità nelle cellule neoplastiche; E-CD - quando vi era la totale scomparsa dell'immunomarcatura dalle cellule neoplastiche. Inoltre, il gruppo E-CD +/- fu ulteriormente classificato in base alla distribuzione della positività della colorazione definendo, quindi, campioni E-CD +/- omogenei quelli in cui la positività interessava l'intera membrana cellulare di tutte le cellule e campioni E-CD +/- eterogenei quando la positività veniva espressa da parti della membrana cellulare e non necessariamente da tutte le cellule.

## RISULTATI

La cute normale e gli annessi presenti nelle sezioni, da noi considerate come controlli positivi interni, presentarono immunoreazione intensa e uniformemente diffusa alla membrana cellulare di tutti i cheratinociti. Facevano eccezione quelli dello strato corneo e, nelle cellule dello strato germinativo, le porzioni di membrana cellulare in rapporto con la membrana basale.

L'immunomarcatura fu osservata in tutti i tessuti neoplastici considerati, ma in buona parte dei casi l'intensità della colorazione era ridotta (E-CD +/-) e spesso eterogenea. Dei 17 carcinomi squamosi (Tab.: I), tutti moderatamente ben differenziati, 4 mantenevano l'intensità e l'omogeneità dell'immunoreazione (E-CD +), paragonabile a quella del tessuto di controllo. In 13 casi fu, invece, osservata una riduzione dell'intensità dell'immunomarcatura (E-CD +/-), che in 3 casi aveva una distribuzione omogenea e nei restanti 10 era distribuita in modo eterogeneo. Nella maggior parte dei carcinomi squamosi E-CD +/- eterogenei, le zone più intensamente colorate (E-CD +) erano quelle maggiormente differenziate, frammiste ad aree E-CD +/- ed E-CD - per lo più caratterizzate da una progressiva perdita della differenziazione.

Dei 3 carcinomi basosquamosi esaminati (Tab.: I) 1 manteneva la positività (E-CD +), un altro presentava un'omogenea riduzione (E-CD +/-) dell'intensità, ed uno presentava un'immunomarcatura ridotta (E-CD +/-) ed eterogenea.

Anche nei basaliomi (Tab.: I) non si verificò mai la completa perdita della positività nelle cellule neoplastiche. In 5 degli 11 campioni l'espressione di Caderina E era mantenuta (E-CD +) e paragonabile al controllo interno positivo, mentre risultava ridotta nei restanti 6 casi. Fra questi ultimi, 1 caso presentava un'omogenea distribuzione della immunomarcatura, mentre nei restanti 5 casi la distribuzione appariva eterogenea.

## DISCUSSIONE

Le Caderine sono una superfamiglia di molecole necessarie al riconoscimento fra cellule vicine, alla morfogenesi e al mantenimento dell'integrità dei tessuti, tanto nei vertebrati quanto negli invertebrati (Buck, 1995). La loro espressione è correlata alla prevenzione dell'invasività da parte delle cellule di vari tumori epiteliali maligni (Behrens *et al.*, 1989). Ridotta espressione di Caderina E è stata osservata in tumori maligni umani di esofago, stomaco, colon, mammella, ovaio e prostata ed è stata correlata ad invasività e capacità metastatizzante (Birchmeir e Behrens, 1994). Resta comunque da chiarire se la riduzione dell'espressione di Caderina E sia un possibile

meccanismo di trasformazione maligna o, più semplicemente una conseguenza della sdifferenziazione neoplastica determinata da altri meccanismi oncogenetici.

Il risultato del nostro studio mostra che un'alterata espressione di Caderina E può essere spesso riscontrata anche in carcinomi squamosi cutanei di cane. Schipper *et al.* (1991) dimostrarono l'esistenza di una correlazione inversa fra l'espressione di Caderina E e la perdita di differenziazione nei carcinomi squamosi di testa e collo dell'uomo. Questi autori trovarono che nei carcinomi squamosi ben differenziati l'espressione di Caderina E era spesso paragonabile, per intensità e distribuzione, a quella dell'epitelio stratificato normale; in quelli moderatamente differenziati l'intensità era minore e la distribuzione spesso eterogenea, mentre nei carcinomi squamosi poco differenziati si verificava la perdita dell'espressione di caderina E. Nel nostro studio abbiamo osservato in buona parte dei carcinomi squamosi una riduzione e/o alterazione dell'espressione di Caderina E, ma in nessun caso la sua completa scomparsa. Non avendo nella nostra casistica nessun caso di carcinoma squamoso poco differenziato possiamo considerare il nostro risultato in accordo con quanto espresso in letteratura che, fra i carcinomi squamosi umani di testa e collo, segnala la scomparsa dell'espressione di Caderina E solo in quelli più sdifferenziati (Schipper *et al.*, 1991; Mattijssen *et al.*, 1993; Kadowaki *et al.*, 1994).

Una ridotta e/o eterogenea espressione di Caderina E è stata inoltre osservata in 2 dei 3 carcinomi basosquamosi. I carcinomi delle cellule basali sono raramente metastatizzanti, ma è noto che quelli della varietà basosquamosa spesso sono localmente più invasivi (Weiss e Frese, 1974). Quindi l'eterogeneità e la sottoespressione di Caderina E riscontrata nei 2 casi citati potrebbe ben correlarsi con la loro maggior invasività. Risultati analoghi vengono riportati da Pizzarro *et al.* (1994; 1995) che indicano una ridotta ed eterogenea espressione di Caderina E nei carcinomi a cellule basali più infiltrativi.

In fine, una ridotta ed eterogenea espressione di Caderina E è stata trovata in 5 degli 11 basaliomi studiati. Resta tuttavia da stabilire se tale riscontro sia da considerare un aspetto legato alla trasformazione neoplastica o non sia, invece, il riflesso e la conseguenza del fenotipo di origine della cellula basale che appare priva di Caderina E nei punti di contatto con la membrana basale.

Il risultato di questo lavoro, in sintesi, evidenzia che la riduzione e la eterogeneità dell'espressione di Caderina E può spesso essere osservata anche nei carcinomi squamosi, nei carcinomi basosquamosi e nei basaliomi cutanei del cane. Si rendono, tuttavia necessari ulteriori studi per valutare le eventuali correlazioni fra la diminuita espressione di Caderina E ed il comportamento clinico di questi tumori.

**Tabella I:** Espressione di Caderina E in carcinomi squamosi, carcinomi basosquamosi e basaliomi cutanei di cane.

	Espressione di Caderina E			
	+	+/-		-
omogeneo		eterogeneo		
<b>Carcinomi Squamosi</b>	4/17	3/17	10/17	0/17
<b>Carcinomi Basosquamosi</b>	1/3	1/3	1/3	0/3
<b>Basaliomi</b>	5/11	1/11	5/11	0/11

### BIBLIOGRAFIA

1. BEHRENS J., MAREEL M.M., VAN ROY F.M., BIRCHMEIER W. (1989) Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion *Journal of Cell Biology* **108**, 2435-2447
2. BIRCHMEIER W. & BEHRENS J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta* **1198**, 11-26
3. BUCK C.A. (1995) Adhesion mechanisms controlling cell-cell and cell-matrix interactions during the metastatic process. In Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Liotta L.A. (eds): *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia, Saunders Co. p177
4. FRIXEN U.H., BEHRENS J., SACHS M., EBERLE G., VOSS B., WARDA A., LOCHNER D. & BIRCHMEIER W. (1991) E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *Journal of Cell Biology* **113**, 173-185
5. KADOWAKI T., SHIOZAKI H., INOUE M., TAMURA S., OKA H., DOKI Y., IIHARA K., MATSUI S., IWAZAWA T., NAGAFUCHI A., TSUKITA S., MORI T. (1994) E-Cadherin and  $\alpha$ -Catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Research* **54**, 291-296
6. MATIJSSSEN V., PETERS H.M., SCHALKWIJK L., MANNI J.J., VAN'T HOF-GROOTENBOER B., DE MULDER P.H.M., RUITER D.J. (1993) e-Cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *International Journal of Cancer* **55**, 580-585
7. PIZARRO A., BENITO N., NAVARRO P., PALACIOS J., CANO A., QUINTANILLA M., CONRTRERAS F., GAMALLO C. (1994) E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* **69**, 157-162
8. PIZARRO A., GAMALLO C., BENITO N., PALACIOS J., QUINTANILLA M., CANO A., CONRTRERAS F. (1995) Differential patterns of placental and epithelial cadherin expression in basal cell carcinoma and in the epidermis overlying tumours. *British Journal of Cancer* **72**, 327-332

9. SCHIPPER J., FRIXEN U.H., BEHRENS J., UNGER A., JAHNKE K., BIRCHMEIER W. (1991) E-Cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Research* **51**, 6328-6337
10. SHIOZAKI H., TAHARA H., OKA H., MIYATA M., KOBAYASHI K., TAMURA S., IIHARA K., DOKI Y., HIRANO S., TAKEICHI M., MORI T. (1991) Expression of immunoreactive E-Cadherin adhesion molecules in human cancers. *American Journal of Pathology* **139**, 17-23
11. TAKEICHI M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455
12. VESTWEBER D., KEMLER R. (1985) Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO Journal* **4**, 3393-3398
13. WEISS E., FRESE K. (1974) Tumours of the skin. In International histological classification of tumours of domestic animals. *Bulletin of the World Health Organization* **50**, 79-100