

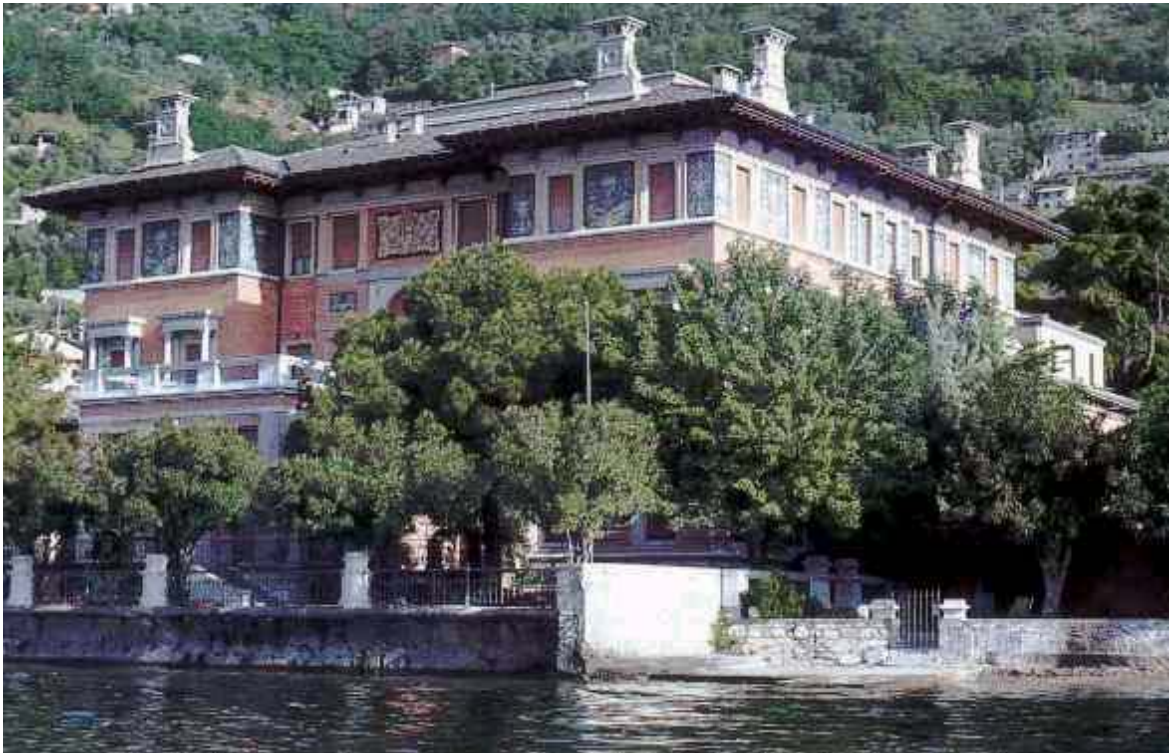
A.I.P. Vet.

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

AIPVet

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

I Congresso Nazionale



con la partecipazione

della Società Italiana di Patologia Tossicologica e Sperimentale

del Gruppo di Patologia Clinica Veterinaria

del Gruppo Veterinario di Analisi di Immagine

**Palazzo Feltrinelli, Gargnano (BS),
30 Aprile - 1 Maggio 2004**

SPONSOR

 <p>OLYMPUS</p> <hr/> <p>Your Vision, Our Future</p>
 <p>DIAPATH</p> <p><i>Experience we share.. Innovation we lead</i></p>
 <p>Histo-Line Laboratories</p>
 <p>SPACE</p> <p>Import-Export s.r.l.</p> <p>www.spacesrl.com</p>
 <p>DBA</p> <p>ITALIA s.r.l.</p> <p>OTC AND SELF TESTING ALLERGOLOGY LAB PRODUCTS PROFESSIONAL DEVICES VETERINARY MEDICAL SUPPLIES SCIENTIFIC PRODUCTS</p>

DALLA REDAZIONE

Cari Soci AIPVet,

siamo al terzo anno (considerando gli scorsi due come APIV), che ha luogo la pubblicazione degli Atti del nostro Convegno Nazionale in formato elettronico.

Vi ringrazio innanzitutto del fattivo contributo per la realizzazione del documento.

Anche quest'anno, analogamente allo scorso anno, è disponibile il volume completo in pdf e la versione html unitamente all'estratto in pdf di ogni presentazione. Ho mantenuto la doppia versione per sfruttare la multimedialità delle pagine html (link all'indirizzo di posta elettronica degli autori, link alle immagini originali ricevute dagli autori, indice che contiene link per gli elenchi di comunicazioni AIPVet, SIPTS, gruppo di patologia clinica veterinaria e gruppo veterinario di analisi di immagine) unitamente all'esigenza di fornire una impaginazione (garantita dal documento in pdf) utile per la citazione nei curricula delle pubblicazioni riportate.

Questo documento, come i precedenti, è disponibile nel nostro sito (<http://www.aipvet.it>) nella sezione AIPVet Meetings, ove è anche possibile scaricarlo. Come per gli scorsi anni, solo gli iscritti al Convegno di Gargnano riceveranno anche il CD.

Un caro saluto a tutti,

Giuseppe Sarli

PREMIO "ENNIO SANNA" 2004

Nell'ambito del I° Congresso della Associazione Italiana di Patologia Veterinaria (AIPVet) tenutosi a Gargnano (BS) il 29 e 30 Aprile 2004 è stato conferito, per la prima volta, il premio "Ennio Sanna" destinato alla migliore presentazione congressuale innovativa.

La commissione giudicatrice, composta dal Prof. Antonio Leoni e dal Prof. Alessandro Poli, ha deciso di premiare la seguente comunicazione:

Studio preliminare sull'espressione immunoistochimica dell'eritropoietina e del suo recettore nel tumore mammario di cane. Sfacteria Alessandra, Mazzullo Giuseppe, Canteri Giovanni, De Vico Gionata, Macrì Battesimo.

Inoltre, la commissione ha indicato come meritevole di segnalazione la seguente comunicazione:

Analisi della espressione di citochine in monociti bovini isolati.

Pocacqua Vanessa, Giordano Alessia, Rinaldi Manuela, Ceciliani Fabrizio, Sartorelli Paola

La premiazione ha rappresentato un momento particolarmente significativo del Congresso. Nella speranza della Associazione tale premio vuole fornire uno stimolo al progresso della ricerca scientifica, in particolare da parte dei giovani patologi veterinari italiani, richiamando la memoria del collega Ennio Sanna prematuramente scomparso.

Eugenio Scanziani

PRESENTAZIONE PLENARIA

**IL RUOLO DEL PATOLOGO VETERINARIO NELLA PATOLOGIA
TOSSICOLOGICA E SPERIMENTALE**

Jan Klapwijk¹ and Patrizia Cristofori².

¹ - Pharmacia - Gruppo Pfizer Inc. Viale Pasteur 10 - 20014 Nerviano (Mi), Italy

² - Glaxo Smith Kline, Verona - Italy

Il contributo del patologo nell'industria farmaceutica (sviluppo di farmaci ad uso umano o veterinario) e chimica e' riconosciuto da molti anni. Tradizionalmente, il ruolo del patologo consisteva nel valutare dati relativi all'indagine post mortem macroscopica e microscopica generati durante gli studi di tossicologia. Tali studi vengono eseguiti in specie roditrici e non roditrici. Gli studi variano notevolmente come lunghezza e da studi estremamente brevi atti a valutare l'effetto acuto di singole somministrazioni di composti chimici o farmaceutici si passa a studi lunghi quanto l'intera durata della vita dell'animale per valutare il potenziale cancerogenico dei vari composti. Per tali motivi, al patologo e' richiesto conoscere la patologia comparativa, la patologia spontanea delle varie specie animali usate e la tossicologia. La maggior parte dei patologi e' di estrazione veterinaria mentre un numero minore sono biologi o patologi medici. Il trend attuale e' quello di indirizzare questa professione ai patologi veterinari. Nel passato, l'addestramento era generalmente eseguito sul posto di lavoro stesso mentre oggi un addestramento specifico post-laurea ed una qualificazione specifica (Dip ECVP) e' generalmente richiesta prima di iniziare la carriera come patologo dell'industria. Oltre a cio' altri cambiamenti culturali sono in atto nell'industria. Per esempio, la valutazione tossicologica dei composti e' stata anticipata di molto nel processo di sviluppo di molecole, il tutto dovuto al riconoscimento di importanti fallimenti avvenuti tardivamente nel processo a causa di riconosciute tossicita', con conseguenti altissimi costi gia' sostenuti e non recuperabili. Inoltre, ai fini di capire il reale significato di alcuni aspetti tossicologici, una strategia complessa e investigativa ha preso piede utilizzando tecniche di patologia genetica e

molecolare. In aggiunta a cio' vi e' stata una vera e propria esplosione di progetti relativi a nuovi target molecolari derivanti dalle accresciute conoscenze di genetica molecolare e l'introduzione di anticorpi o terapie geniche. Le variazioni patologiche indotte da questi composti hanno introdotto diverse tecnologie molecolari (eg. PCR, ISH..) prima utilizzate piu' raramente contribuendo al susseguirsi di nuove specializzazioni in questo campo.

Parole chiave: patologo veterinario, patologo tossicologo, patologia comparativa

The role of the veterinary pathologist in toxicological and experimental pathology. Pathologists have been employed in the pharmaceutical (human and animal) and industrial chemical industry for many years. Their role has traditionally been to generate and evaluate gross and microscopic data from animal safety studies. These studies are carried out in a number of rodent and non-rodent species. They vary in duration from very short studies, examining the acute effects of a single administration of test compound, to lifetime studies assessing the tumor-inducing potential of compounds. Therefore, the pathologist needs a sound understanding of comparative pathology, spontaneous pathology and toxicology. The majority of pathologists employed in this area have a veterinary background, with biologists and medically qualified scientists making up a smaller number. The current trend is for new positions to be filled almost exclusively by veterinary pathologists. Whilst in the past pathologists were often trained "on the job" many are now obtaining a post-graduate training and qualification (eg DipECVP) prior to starting their industrial career.

A number of other trends have been seen in the last decade (in the pharmaceutical industry at least). Most notably, initial toxicological (and, therefore, pathological) evaluation of potential new pharmaceuticals has begun much earlier in the drug discovery process. This was driven by the recognition that serious toxic liabilities need to be identified early in order to avoid the high cost of failure of a drug in later stages of development. Accompanying this has been the need to use more imaginative investigative strategies in order to understand the real significance of any toxicological findings.

A second trend has been the explosion in knowledge (driven by the genome project) of potential new targets for therapeutic intervention plus the advent of new classes of pharmaceuticals to modulate these targets eg monoclonal antibodies, gene therapy. A working knowledge of these new targets and therapies as well as an appreciation of “new” experimental techniques (eg PCR, in situ hybridisation) is essential for understanding some of the changes induced by these compounds. This has led to many pathologists now specialising in these areas.

Key words: Veterinary pathologist, toxicological pathology, comparative pathology.

PRESENTAZIONE PLENARIA

THE ROLE OF CLINICAL PATHOLOGY IN VETERINARY MEDICINE

Joy Archer

Queen's Veterinary School, University of Cambridge, Cambridge, U.K.

Clinical pathology is beginning to play an increasingly more important role as veterinary diagnosis and therapy become more centered on evidence based medicine methods. Laboratory medicine provides an important part of the information that is used for these analytical approaches to medicine. It has an unique role as an essential bridge between the practitioner of veterinary medicine and the practitioners of laboratory science and morbid /anatomical pathology. As veterinary medicine evolves and becomes more sophisticated and the demands for different levels of care and services expand along with the expansion and applications of biotechnology in the laboratory the need for a discipline /specialty which can interrelate and act as a catalyst between these areas increases. Clinical pathology is ideally placed to play this central role.

Clinical pathology /Laboratory medicine has evolved and expanded from isolated disciplines of haematology, clinical biochemistry, cytology, immunology, and embraced other areas like laboratory management and quality assurance and control. Perhaps most importantly the synthesis and interpretation of data from many areas of laboratory medicine in relation to the disease process is a key function of the clinical pathology specialist.

In practical terms, clinical pathology with its associated "omics" proteomics metabolomics to name a few, can provide rapid ante-mortem information to both the clinician and to the study

director scientist in research and pharmaceutical clinical trials situations. It is complementary to classical pathology in that cytology can be a valuable rapid precursor or alternative to histopathology in many clinical situations. Ante-mortem laboratory medicine information can add an extra dimension to the understanding of early pathophysiological mechanisms leading to the final pathological basis of changes found in many clinical and experimental situations.

With the rapid advancements in biotechnology and computer and information technology the ability to perform laboratory tests with sophisticated, but simple to use equipment in any veterinary practice is expanding rapidly. This development has seen the role of the clinical pathologist change. Now there is a greater need for the specialist to take on the role of educator and advisor to his/her clinician colleagues. One good way to do this is through regular continuing education short courses. In these the practicing veterinarian can gain understanding and insight into the best way to adapt and use such equipment to serve his /her diagnostic needs. There are often numerous disadvantages to the isolated small in practice laboratory. Not least of these is the maintenance of the assurance of the generation of good quality results and correct interpretation of those obtained. Also in this way veterinarians become aware of new developments and the specialist abilities of clinical pathologists in areas like cytology and endocrinology and immunology testing and interpretation to mention a few.

NEFROBLASTOMA SUINO E BOVINO: ASPETTI ISTOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI

Grieco Valeria, Belotti S., Scanziani Eugenio

DiPAV, Sezione di anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Milano

Riassunto

5 casi di nefroblastoma suino e 2 di bovino sono stati studiati istologicamente e immunoistochimicamente utilizzando i seguenti anticorpi primari: CK AE1/AE3, CK 8-18, CK5, 13, 15, 16 e 19, vimentina, actina muscolare liscia, laminina e Fattore VIII. Istologicamente nei casi suini, divisa in lobuli da tralci connettivali, era presente una componente mesenchimale (blastematica) in cui si sviluppavano strutture similtubulari e similglomerulari. Le prime ricalcavano le forme dell'evoluzione renale embrionaria (forma di vescicola, di "C", di "S"). Le seconde somigliavano ad un glomerulo vestigiale (in assenza di capillari sanguigni) o, apparivano come corpi glomeruloidi formati da un doppio strato epiteliale a mezzaluna (epitelio parietale e viscerale della capsula di Bowman). Nei nefroblastomi bovini si osservavano aree necrotiche e la componente blastematica era quasi assente. Essi, inoltre, avevano caratteri diversi tra loro: uno mostrava corpi glomeruloidi indifferenziati e rari tubuli, l'altro cavità cistiche in cui si sviluppavano lunghe digitazioni epiteliali di tipo papillare. All'immunoistochimica il mesenchima era vimentina positivo mentre i setti connettivali coesprimevano actina (miofibroblasti). In suini e bovini, le cellule degli abbozzi tubulari erano positive per vimentina esprimendo anche citocheratina AE1/AE3 ed 8-18, a mano a mano che nell'abbozzo si apriva un lume. La positività alla CK19 era, invece, sempre presente. Le strutture similglomerulari esprimevano citocheratine (in particolare per la 19) quando appena abbozzate, mentre nei glomeruli d'aspetto quasi normale le cellule assimilabili all'epitelio viscerale della capsula di Bowman acquisivano positività per vimentina. L'assenza dei capillari glomerulari era documentata dalla negatività per Fattore VIII. Concludendo, pur esistendo una differenza morfologica tra nefroblastomi suini e bovini, la positività costante di entrambe le forme per CK

19, marker transitorio della differenziazione epiteliale, ben combacia con la natura embrionaria tipica di questa neoplasia.

Parole chiave: nefroblastoma, suino, bovino, istologia, immunoistochimica.

Summary

Swine and bovine nephroblastoma: histological and immuno-histochemical findings. Sections from 5 swine and 2 bovine nephroblastomas were stained with Hematoxylin-Eosin and immunohistochemically for CKAE1/AE3, CK8-18, CK5, 13, 15, 16 e 19, vimentin, smooth-muscle actin, laminin, and Factor VIII. Histologically, in a mesenchimal component, swine samples showed pseudotubular comma-shaped, "C" and "S"-shaped structures together with more and less differentiated glomeruloid bodies. In the bovine nephroblastomas, necrotic foci were present while mesenchima was almost absent. Moreover, the 2 bovine cases showed different patterns. One presented large glomeruloid bodies and rare tubules, the other showed large cysts filled by long epithelial papillary structures. Immunohistochemically mesenchima was positive for vimentin. Differentiated tubuli expressed CK AE1/AE3, CK8-18 and CK19 while, in earlier stages, they were positive only for vimentin and CK19. More differentiated glomeruloid bodies showed positivity for CK in the parietal epithelium and for vimentin in the visceral epithelium. Less differentiated glomeruloid bodies were negative for vimentin and positive for cytokeratins (mainly CK19). In spite of some morphological differences observed between swine and bovine nephroblastomas, the constant positivity of neoplastic structures for CK19, typical of differentiating epithelia, corresponds, in both species, with the embryonal pattern typical of nephroblastoma.

Key words: nephroblastoma, swine, bovine, histology, immunohistochemistry.

CARCINOMA AMELOBLASTICO ACANTOLITICO IN UN CAVALLO

*Rondena Marco**, *Capitelli Raffaella*[§], *Vezzadini Lorenzo*[†], *Di Giancamillo Mauro*[‡], *Roccabianca Paola**

* DiPAV, sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Milano

[§] Laboratorio Analisi Veterinarie, Clinica San Siro, Milano

[†] Clinica La Pinetina, Limido Comasco (CO)

[‡] Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Milano

Riassunto. Un cavallo purosangue inglese, femmina di 14 anni veniva esaminata per la presenza di una tumefazione dell'arcata mandibolare sinistra. All'esame radiografico si evidenziava una lesione di aspetto a "vetro soffiato" interpretata come una osteomielite ma che non regrediva con la terapia antibiotica. Venivano effettuati un prelievo citologico, risultato in conclusivo, ed una biopsia suggestiva di una neoplasia dentaria. Dopo l'eutanasia la testa era sottoposta ad esame TC da cui si evidenziava un'estesa area osteolitica a carattere espansivo, prevalentemente monoconcamerata, a carico del corpo mandibolare sinistro, nel cui contesto alcuni denti molari apparivano completamente avulsi. La risposta periostale appariva minima e si estendeva aboralmente sino a comprendere il ramo mandibolare. Tali reperti venivano confermati dall'esame macroscopico della cavità orale. Campioni di tessuto venivano fissati, processati ed inclusi in paraffina. Sezioni di 4 micron erano colorate con Ematossilina ed Eosina e con anticorpi monoclonali diretti contro vimentina, citocheratina (CK) AE1/AE3, CK 8/18, CK19, CK 7, CK 5, CK 14. Microscopicamente la neoplasia si disponeva in lobuli, spesso cistici, accompagnati da intensa desmoplasia. L'istologia era compatibile con una rara variante di carcinoma ameloblastico. Non si evidenziavano emboli neoplastici o metastasi ai linfonodi retromandibolari. Il 30% delle cellule al centro dei lobuli esprimeva vimentina e Ck 5. I lobuli erano positivi a CK AE1/AE3, CK 5 e CK 14. La reattività confermava l'origine dentaria del tumore. I tumori dell'epitelio dello smalto sono considerati infrequenti nell'uomo e negli animali domestici e ancora più rari nel cavallo. Il nostro caso mostrava reperti istologici ed immunoistochimici sovrapponibili a quanto descritto in bibliografia umana e veterinaria per quanto riguarda i carcinomi ameloblastici.

Parole chiave: cavallo, carcinoma, ameloblastico, mandibola

Summary. **Achantolytic ameloblastic carcinoma in a horse.** A female, 14 years old thoroughbred had severe enlargement of the left mandible. X-rays showed a osteolytic bone lesion that did not respond to antibiotic therapy. Cytologic specimens were non-diagnostic while a surgical biopsy was consistent with a malignant dental neoplasm. The horse was euthanized and the head was examined by CT scan. An expansile osteolytic unilocular large mass was evidenced in the mandible. Some molar teeth were lost and a minimal periosteal reaction extending aborally was observed. These findings were confirmed by gross examination. Formalin fixed material was routinely processed and stained with haematoxylin and eosin and with antibodies recognizing vimentin, cytokeratin (CK) AE1/AE3, CK 8/18, CK19, CK 7, CK 5, CK 14. The neoplasm was composed of multiple, often cystic, lobules embedded in abundant desmoplastic stroma. These finding were consistent with a rare histological variant of ameloblastic carcinoma. No intravascular neoplastic emboli or submandibular lymphnode metastases were evidenced. Approximately 30% of the cells in the centre of the lobules co-expressed vimentin and Ck5. Most neoplastic epithelial cells were Ck AE1/AE3, CK 5 and CK 14 positive. Immunohistochemistry confirmed the dental origin of the neoplasm. Neoplasms originating from the dental enamel are considered infrequent in humans and domestic animals and extremely rare in horses. This case was characterized by histology and immunohistochemistry consistent with the current literature for ameloblastic carcinomas.

Keywords: horse, carcinoma, ameloblastic, mandible.

CONDROSARCOMA MESENCHIMALE CUTANEO IN UN GATTO

Romanucci Mariarita, Bongiovanni Laura, Petrizzi Lucio, Della Salda Leonardo*

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo;

*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

Riassunto

Un gatto, incrocio Siamese, maschio, di circa 4 anni è stato sottoposto a visita clinica per la presenza di una massa di 4 cm di diametro, non mobile, localizzata a livello del sottocute della regione lombo-sacrale. L'esame istopatologico di tale massa, sottoposta ad exeresi chirurgica, ha messo in evidenza una neoformazione, ben circoscritta, ma non incapsulata, costituita da cellule di tipo prevalentemente fusato, con nuclei grandi, nucleoli evidenti ed elevata attività mitotica; frammisti a tali cellule, era possibile osservare anche singoli elementi cellulari con differenziazione condroide e cellule giganti multinucleate. Nell'ambito del parenchima neoplastico, erano presenti anche ampie aree di tessuto cartilagineo, con focolai di ossificazione endondrale, e vaste zone di necrosi. Sulla base del pattern istologico, caratterizzato dalla coesistenza di isole di tessuto cartilagineo e di cellule mesenchimali indifferenziate, e considerati i risultati ottenuti mediante la colorazione istochimica Alcian a vari pH, nonché la positività immunohistochimica nei confronti di vimentina e S-100 e l'assenza di coinvolgimento scheletrico o di altri siti primari di insorgenza della neoplasia è stata formulata una diagnosi di condrosarcoma mesenchimale extrascheletrico. Tale neoplasia, estremamente rara, è stata descritta sia nel cane che nell'uomo, con varie localizzazioni corporee; per nostra conoscenza, essa non risulta invece segnalata in forma mesenchimale nella specie felina, dove il condrosarcoma rappresenta anche una possibile forma di sarcoma vaccinale. L'anamnesi di tale soggetto non riferiva tuttavia di interventi vaccinali o di inoculazioni di altro tipo nel sito di localizzazione della neoplasia. A circa sei mesi di distanza dall'intervento, non sono state evidenziate né recidive, né metastasi.

Parole chiave: condrosarcoma mesenchimale extrascheletrico, cute, gatto.

Summary

Cutaneous extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma in a cat. A 4-year-old male cat was presented with a fixed, subcutaneous mass in the lumbosacral region. The mass was surgically removed and the histopathological examination revealed a well defined but non-capsulated neoplasm characterized predominantly by a proliferation of spindle cells with large nuclei, prominent nucleoli and high mitotic activity. Interspersed between these cells were single cellular elements with chondroid differentiation and multinucleated giant cells. Large areas of chondroid tissue with foci of endochondral ossification and widespread necrosis were also observed within the neoplastic parenchyma. On the basis of the histological pattern, characterized by the coexistence of the cartilaginous islands and the undifferentiated mesenchymal cells, and given also the results of Alcian staining at various pH, the immunohistochemical reactivity against vimentin and S-100 protein, and the absence of skeletal involvement or other primary tumour sites, a diagnosis of extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma was made. This is a rare tumour which has been described in dogs and humans in varying parts of the body, while, to our knowledge, it has not been reported in the mesenchymal form in the cat, in which it can also represent a possible type of post-vaccinal sarcoma. However, no vaccination or other types of inoculation at the tumour site were reported in the clinical history of this case and six months on from surgical treatment neither recurrence nor metastasis have been detected.

Key words: extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma, skin, cat.

IPERPLASIA E TUMORI DELL'EPITELIO DEI CORPI CILIARI: ASPETTI ISTOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI

Giudice Chiara, Ghisio Valeria, Rondena Marco, Parodi Margherita, Cammarata Giorgio.

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare.

Riassunto. I tumori dei corpi ciliari (TCC) sono rari sia nell'uomo che nel cane. Forme iperplastiche dell'epitelio dei corpi ciliari sono state descritte nell'uomo e denominate in vario modo (es. adenoma coronale, adenoma di Fuch).

Scopo di questo lavoro è di caratterizzare, immunofenotipicamente, iperplasie e TCC e di identificare criteri distintivi di possibile valore prognostico.

Sono stati pertanto esaminati 12 TCC (5 adenomi, 7 adenocarcinomi) in 12 cani di differenti razze, età tra 6 e 12 anni, 5 femmine/7 maschi. I tumori sono stati confrontati con altrettante forme iperplastiche osservate in occhi di cani di età, razza e sesso comparabile. L'esame immunohistochimico è stato eseguito con metodo ABC, utilizzando un pannello di anticorpi (VIM, CK AE1/AE3, CK 8/18, NSE, SY, GFAP, CgA). L'origine primitiva intraoculare delle neoplasie ed il loro grado di differenziazione è stata definita in base a criteri istologici precedentemente accreditati da altri autori. Immunohistochimicamente sono risultati positivi 11/12 TCC e 12/12 iperplasie per Vim, 10/12 TCC e 3/12 iperplasie per CK AE1/3, 10/12 TCC e 12/12 iperplasie per NSE, 1/12 TCC e 0/12 iperplasie per CK8/18, 6/12 TCC e 12/12 iperplasie per SY. GFAP è risultata costantemente negativa, CgA ha dato risultati incostanti. L'epitelio dei corpi ciliari normale è risultato Vim, SY ed NSE positivo, CKAE1/3, CK8/18, GFAP e CgA negativo.

In base ai risultati 2 tumori sono stati riclassificati come metastatici (NSE e/o VIM -, AE1/3 +). Le forme iperplastiche sono risultate immunofenotipicamente distinte dalle forme neoplastiche. L'espressione di CK è risultata di percentuale ed intensità crescente dalle forme iperplastiche a quelle neoplastiche. CK8/18 (considerata l'unica ck espressa dal neuroepitelio ciliare dell'uomo) non è risultata espressa nel cane.

Parole chiave: Corpi ciliari, adenoma, adenocarcinoma, iperplasia, immunohistochimica, adenoma Fuch.

Summary. Ciliary body tumors (CbT) are rare both in humans and in dogs. Cb focal hyperplasia has been described in humans, and variably named (e.g. coronal adenoma, Fuch's adenoma). Aim of this study was to immunohistochemically characterize canine CbT and hyperplasias in order to identify distinctive criteria with a possible prognostic value.

12 CbT (5 adenomas, 7 adenocarcinomas) from 12 dogs, 6 to 12 years, 5 females and 7 males, of different breeds, were examined and compared with cb hyperplastic lesions in 12 globes of matched age, sex and breed dogs. Immunohistochemistry was performed with ABC method, with a panel of antibodies (VIM, CK AE1/AE3, CK 8/18, NSE, SY, GFAP, CgA). Primary intraocular origin and malignancy degree of tumors were defined based on previously determined guidelines. Immunohistochemically 11/12 CbT and 12/12 hyperplasias were Vim +, 10/12 CbT and 3/12 hyperplasias CK AE1/3 +, 10/12 CbT and 12/12 hyperplasias NSE +, 1/12 CbT and no hyperplasia CK8/18 +, 6/12 CbT and 12/12 hyperplasias SY +. GFAP was always negative, CgA was inconstantly expressed. Normal Cb epithelium stained Vim, SY and NSE positive, CKAE1/3, CK8/18, GFAP and CgA negative. Based on our results 2 CbT were reclassified as metastatic (NSE and/or VIM -, AE1/3 +). Hyperplastic lesions were immunohistochemically distinct entities from CbT. CK 8/18 stained always negative in dogs, whereas it has been considered the only ck expressed in the human neuroepithelium.

Key word: Ciliary body, adenoma, adenocarcinoma, hyperplasia, immunohistochemistry, Fuch's adenoma.

ANALISI DELLA ESPRESSIONE DI CITOCHINE IN MONOCITI BOVINI ISOLATI

Pocacqua Vanessa, Giordano Alessia, Rinaldi Manuela, Ceciliani Fabrizio, Sartorelli Paola.

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Via Celoria 10, 20133 Milano

Riassunto

Le cellule mononucleate CD14⁺ partecipano alla risposta immunitaria mediante la processazione e la presentazione degli antigeni producendo fattori di crescita, citochine e recettori di membrana necessari per la modulazione della risposta stessa. Per poter studiare le interazioni cellulari che si realizzano nel contesto della risposta immunitaria del bovino è necessario disporre di a) una popolazione cellulare abbondante ed omogenea e b) strumenti che permettano una valutazione sia qualitativa che quantitativa della espressione delle molecole che di volta in volta partecipano alla modulazione della risposta immunitaria.

Questa comunicazione descrive una procedura di purificazione per ottenere in forma omogenea le cellule CD14⁺ a partire da sangue bovino, ed un protocollo per valutare mediante PCR Real Time il rapporto di espressione di quelle citochine e recettori di membrana maggiormente coinvolti nei processi di immunità innata. Le citochine che sono state prese in considerazione sono citochine pro-infiammatorie (IL-1, TNF- α), citochine anti-infiammatorie (IL-1 beta antagonist) e proteine di membrana (CD18, IL-8 receptor), utilizzando il gene GAPDH come gene housekeeping.

Le cellule CD14⁺ sono state purificate mediante magnetic-sorting, utilizzando anticorpi anti-CD14 magnetizzati. Questa tecnica ci ha permesso di ottenere circa 30 milioni di cellule CD14⁺ con una omogeneità del 99% a partire da 100 ml di sangue bovino. Per la valutazione dell'espressione delle citochine, l'estrazione del mRNA e la retrotrascrizione in cDNA è stata condotta mediante l'utilizzo di kit commerciali utilizzando il primer Oligo dT.

La Real Time PCR è stata effettuata mediante procedura SYBR GREEN utilizzando un iCycler iQ Real-Time PCR Detection System. La quantificazione relativa della espressione delle citochine è stata analizzata con il metodo del $\Delta\Delta C_t$ e normalizzando i dati rispetto al gene

housekeeping GAPDH. Il valore viene calcolato come n-volte la differenza di trascrizione dei geni in studio delle cellule stimulate rispetto a quelle di controllo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Parole chiave: Monociti, bovino, citochine, Real-Time PCR.

Summary

Cytokine mRNA levels in isolated bovine monocytes. Cells of monocyte lineage participate in immune response by processing and presenting antigens and by producing cytokines, membrane receptors and growth factors that modulate immune response. In order to study cellular interactions in the immune responses of cattles, it is necessary to set up reliable methods to a) obtain highly enriched mononuclear phagocytes populations and b) evaluate the expression ratio of the cytokines involved in immune response.

The present communication describes a method for purify the CD14⁺ cells from bovine blood, and a procedure to evaluate and quantify by Real Time PCR the expression of cytokines and membrane receptors that are most involved in the modulation of immune response, including IL-1, TNF- α , IL-8 receptor, IL-1 beta antagonist, CD18, using GAPDH as housekeeping gene.

CD14⁺ cells have been purified by means of magnetic sorting. The expression of cytokines has been determined after mRNA extraction and reverse transcription using commercial standard procedures and Oligo dT primer. Real Time PCR has been carried out by means of SYBR GREEN technique on iCycler iQ Real-Time PCR Detection System.

Relative quantitation of cytokines was calculated as an n-fold difference in transcription of the respective cytokines from control samples ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), using GAPDH as housekeeping gene.

Keywords: monocytes, bovine, cytokines, Real-Time PCR.

Introduzione

Le cellule mononucleate CD14⁺ partecipano alla risposta immunitaria mediante il processamento e la presentazione degli antigeni producendo fattori di crescita, citochine ed antigeni di membrana necessari per la modulazione della risposta stessa (1) (2). Per poter studiare le interazioni cellulari che si realizzano nel contesto della risposta immunitaria del bovino è necessario disporre di a) una popolazione cellulare abbondante ed omogenea e b) strumenti che permettano una valutazione sia qualitativa che quantitativa della espressione delle molecole che di volta in volta partecipano alla modulazione della risposta immunitaria.

Questa comunicazione descrive una procedura di purificazione per ottenere in forma omogenea le cellule CD14⁺ a partire da sangue bovino ed un protocollo per valutare, mediante PCR Real Time, l'aumento dell'espressione delle citochine e dei recettori di membrana maggiormente coinvolti nei processi di immunità innata considerate nel presente studio. Le citochine che sono state prese in considerazione sono citochine pro-infiammatorie (IL-1 beta, TNF-alpha), citochine anti-infiammatorie (IL-1 beta receptor antagonist) e proteine di membrana (CD18, IL-8 receptor), utilizzando inoltre il gene GAPDH come gene housekeeping.

Materiali e metodi

I monociti vengono recuperati dal sangue bovino intero (3) il cui volume di partenza è 100-150 ml in EDTA aliquotato in Falcon da 15 ml. Il primo step di purificazione consiste in una centrifugazione a 1000 x g per 20 min a temperatura ambiente che porta alla formazione del buffy coat il quale viene recuperato e diluito in PBS 20 mM EDTA ice cool. Quest'ultimo si stratifica successivamente su un gradiente di Ficoll e si centrifuga a 1500 x g per 30 min a 4°C. L'anello dei mononucleati viene quindi risospeso in 50 ml di PBS 20 mM EDTA ice cool. Per eliminare le piastrine rimaste in soluzione si eseguono lavaggi di 7 minuti a 400 x g. Lo scopo della purificazione è recuperare tutte le cellule CD14⁺ e per fare ciò si utilizza il sistema MACS CD14 Microbeads. Questo protocollo utilizza degli anticorpi anti CD14 legati covalentemente con particelle magnetizzate di ferro di circa 1 nm

di diametro. Gli anticorpi riconoscono le cellule d'interesse, che nel nostro caso sono le cellule CD14⁺, e le legano marcandole magneticamente. L'incubazione avviene per 15 minuti a 4°C. Le cellule vengono quindi lavate mediante centrifugazione, risospese in tampone PBS contenente 2.5 mM EDTA e 0.5% albumina ed, in ultimo, caricate su di una colonna contenente ferro magnetizzato ed inserita in un campo magnetico molto forte. I CD14⁻ vengono eluiti immediatamente perché, non essendo marcati con anticorpi magnetizzati, non sono attratti dal campo magnetico mentre quelli positivi sono eluiti a pressione previa eliminazione del campo magnetico. La popolazione cellulare che sarà utilizzata per gli esperimenti di stimolazione successivi viene risospesa in terreno di adesione D-MEM + 10% FCS (fetal calf serum). Le cellule vengono fatte aderire in flask, precedentemente trattate con gelatina, per circa 2 ore e ad una concentrazione di 3 x 10⁶ cellule per flask. Terminata l'adesione si procede alla stimolazione mediante LPS (lipopolisaccaridi) (4) alla concentrazione di 10 ng/ml di coltura ai tempi stabiliti di 1 h, 2 h e over-night. Tutte le cellule sono state poi staccate con l'utilizzo di una soluzione di dissociazione e mediante scraper meccanico. Le cellule recuperate vengono congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

Per l'analisi della variazione dell'espressione delle citochine, l'RNA viene estratto sia a partire dai 3 milioni di cellule appena purificate che da quelle messe in coltura e stimolate a diversi tempi di stimolazione. L'estrazione è stata condotta mediante l'utilizzo del kit QIAGEN RNeasy MINI KIT eseguendo, inoltre, un doppio trattamento di DNasi per eliminare eventuali residui di DNA che fungerebbero da contaminanti nella successiva reazione di Real Time PCR. Dopo aver verificato la purezza dell'RNA si è effettuata la retrotrascrizione con il KIT Amersham Ready-to-Go You Prime First-Strand Beads ed utilizzando il primer Oligo dT.

Di ogni gene d'interesse si è cercata in banca dati la relativa sequenza nucleotidica per il successivo disegno dei primers. Non per tutti i geni in analisi è stato possibile ottenere la sequenza genomica con l'esatta identificazione dei relativi introni ed esoni. Per molti di essi, essendo disponibile solo la sequenza dell' mRNA o della sequenza

codificante, si è stati costretti ad eseguire un paragone con i corrispettivi geni umani per poter delineare i confini degli introni e degli esoni.

La successiva Real Time PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 μ l con metodica SYBR GREEN; la composizione della miscela di reazione è la seguente: 12,5 μ l IQ SYBR GREEN SUPERMIX, 0,5 μ l di ciascun primer (200 ng/ μ l), da 1 a 4 μ l di campione, H₂O a volume. Per stabilire le temperature ottimali alle quali condurre gli esperimenti per ciascuna citochina sono state effettuate precedentemente delle PCR Real Time in gradiente. Per verificare, inoltre, la bontà dei primer disegnati si è condotta, per ciascun esperimento di Real Time, la curva di Melting (opzione aggiuntiva del software che permette di rilevare la presenza o meno di contaminanti nella miscela di reazione).

La quantificazione relativa del segnale delle citochine è stato analizzato con il metodo del $\Delta\Delta C_t$ e normalizzando i dati rispetto al gene housekeeping GAPDH. L'aumento dell'espressione viene calcolato come n-volte la differenza di trascrizione dei geni in studio delle cellule stimulate rispetto a quelle di controllo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Risultati e discussione

La tecnica MACS CD14 MicroBeads ci ha permesso di ottenere mediamente 30 milioni di cellule CD14⁺ a partire da 100 ml di sangue bovino con una omogeneità elevata e senza problemi di contaminazioni. Il vantaggio più evidente di questa tecnica è la notevole selettività del sorting, che assicura una purezza che molto spesso supera il 99% (come mostrato dalle immagini prima e dopo il caricamento in colonna, Fig. 1 e 2). Le cellule si presentano meno attivate rispetto ai protocolli che prevedono l'adesione e, dal momento che la tecnica è relativamente rapida, presentano anche una elevata vitalità. Altro punto a favore è che non presenta lo svantaggio principale caratteristico, al contrario, della metodica di aderenza, e cioè che si seleziona una popolazione cellulare, quella che aderisce, nell'ambito della popolazione, che spesso è molto più vasta, di tutte le cellule CD14⁺ (queste ultime comunemente chiamate monociti). Questa popolazione può variare dal 40% al 90% fra tutte le cellule CD14⁺ circolanti. Altro punto a sfavore

della tecnica per aderenza è che induce una forte attivazione delle cellule, dal momento che vede coinvolti due fra i recettori più attivabili dei monociti, il CR3 e lo Scavenger Receptor

Si sono eseguiti, inoltre, esperimenti preliminari per stabilire la concentrazione ottimale con cui stimolare le cellule che, alla fine, è risultata essere di 10 ng/ml di coltura.

I risultati ottenuti, per quanto concerne il disegno dei primers per le citochine di interesse, dei recettori di membrana e del gene housekeeping, hanno mostrato la presenza di prodotti unici e specifici per tutti i geni presi in esame sia in PCR classica per un primo screening che, successivamente, negli esperimenti di Real Time.



Figura 1. Citocentrifugato della composizione cellulare dell'anello dei mononucleati (da Ficoll) come appare dopo purificazione dalle piastrine.

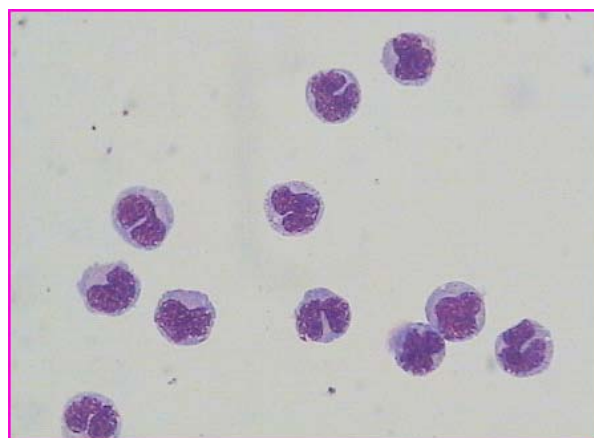


Figura 2. Citocentrifugato della composizione cellulare delle cellule CD14⁺ come appaiono dopo l'ultimo passaggio di purificazione mediante MACS.

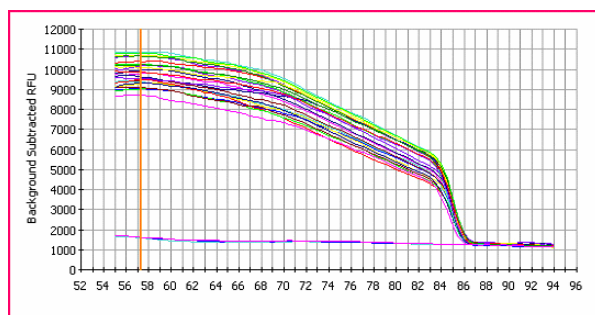


Figura 3. Punto di flesso della Curva di Melting per IL1 beta.

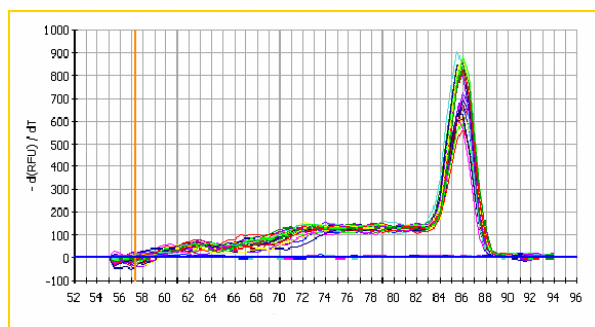


Figura 4. Picco ottenuto dopo elaborazione del punto di flesso della Curva di Melting di IL1 beta da parte del software.

Mediante l'utilizzo della curva di Melting in Real Time è stato possibile controllare la presenza di fluorescenza non-specifica dovuta ad eventuali contaminazioni nell'esperimento effettuato, come può mostrare, ad esempio, la curva di Melting per l' IL1 beta. Nella Fig.3 si può ben vedere come il punto di flesso viene elaborato dal software e trasformato in un solo picco (Fig.4) corrispondente al solo prodotto di PCR. Ulteriore obiettivo conseguito è stato la messa a punto delle condizioni per condurre gli esperimenti in Real Time, in particolare: la composizione della miscela di PCR, delle concentrazioni dei reagenti e del campione stesso, la temperatura alla quale viene condotto l'esperimento e la successiva elaborazione dei dati ottenuti.

Conclusioni

L'obiettivo principale di questa prima parte del lavoro è stato la messa a punto sia della metodica di purificazione dei monociti da sangue bovino con l'utilizzo della tecnica MACS CD14 Microbeads sia dei parametri generali della Real-Time PCR relativa ai geni in studio. Per quello che riguarda la parte di purificazione delle cellule CD14⁺, la tecnica utilizzata ha permesso di ottenere una elevata quantità di cellule, di un ordine di grandezza assolutamente sufficiente per condurre tutti gli esperimenti, in un lasso di tempo ragionevole, tale da ridurre al minimo l'attivazione basale dei monociti, cellule estremamente attivabili da questo punto di vista.

Un altro aspetto del progetto è costituito dalla valutazione del pattern di citochine espresso a seguito di stimolazione delle cellule CD14⁺ mediante LPS e a questa sarà rivolta maggiormente la nostra attenzione ora che l'intero protocollo è stato definito. Lo sviluppo successivo del progetto prevede la stimolazione delle cellule CD14⁺ anche con altre molecole come l' α -1 glicoproteina acida (AGP), e quindi la valutazione dell'espressione del mRNA codificante per alcune citochine pro-infiammatorie, come la IL-1 ed il TNF- α , e di alcune citochine anti-infiammatorie, come per esempio la IL-1Ra.

Bibliografia

1. Hochepleid T., Van Molle W., Berger F.G., Baumann H. and Libert C. Involvement of the acute phase protein alpha-1-acid glycoprotein in non specific resistance to a lethal gram-negative infection. *J Biol Chem*, 275, 14903-14909. (2000)
2. Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1317, 84-94. (1996)
3. Paulnock D. M. *Macrophages: a practical approach.* Oxford University Press, Great Britain, 2000
4. Wright SD, Ramos R.A. CD 14, a receptor for complexes of LPS and LBP. *Science* 1990;249:1431-33

**ATTIVAZIONE IN VITRO DI GRANULOCITI NEUTROFILI DI BOVINO:
MODIFICAZIONE DELLA DENSITÀ E DELL'ESPRESSIONE DI INTEGRINE**

Spagnolo Valentina, Giordano Alessia, Comazzi Stefano, Sartorelli Paola

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Università degli Studi di Milano

Riassunto

I granulociti neutrofili (PMNs) di bovino, attivati mediante aggiunta di lipopolisaccaridi (LPS) per simulare uno stato flogistico, mostrano alterazioni della densità cellulare in confronto a cellule non attivate, in analogia con quanto già osservato in condizioni di flogosi *in vivo*. Mediante l'uso di gradienti discontinui di Percoll è stato possibile standardizzare l'isolamento di una popolazione di PMNs con elevatissimi livelli di purezza in corrispondenza della densità maggiore di Percoll utilizzata. Nei campioni attivati, però, la purezza va a scapito della percentuale di recupero, che migliora notevolmente se alle cellule che sedimentano alle densità superiori vengono aggiunte quelle recuperabili in corrispondenza delle densità intermedie, compromettendo solo lievemente la percentuale di purezza (contaminazione da eosinofili). Le indagini citofluorimetriche hanno dimostrato che i PMNs attivati, rispetto a quelli non attivati, sono di dimensioni superiori, di minore densità ed esprimono maggiormente sulla membrana l'integrina CD11b.

Parole chiave: neutrofili, bovino, citofluorimetria, Percoll

Summary

In vitro activation of bovine neutrophils: changes in density and in integrins expression.

Bovine neutrophils (PMNs) activated by incubation of blood samples in presence of lipopolysaccharides (LPS) showed changes in density levels respect to non activated samples, as previously observed under spontaneous inflammatory conditions. By the mean of discontinuous Percoll gradients it was possible to separate blood PMNs with very high yield and purity percentages at the highest Percoll concentration used. In activated samples the percentage of purity affects that of recover. The

latter appears improved if the recover includes not only the cells that settle in correspondence of the highest Percoll concentration, but also those at the mean Percoll concentration, thus only slightly compromising purity levels. Flow cytometry demonstrated that activated PMNs are larger and show lower density and higher expression of integrins CD11b than non activated PMNs.

Key words: neutrophils, bovine, flow cytometry, Percoll

Introduzione

Eventuali deficit funzionali a carico dei granulociti neutrofili (PMNs), che svolgono un ruolo fondamentale nella difesa contro i germi patogeni, comportano una maggiore predisposizione all'insorgenza di malattie infettive e di processi infiammatori in genere. Soprattutto le forme subacute, clinicamente non manifeste, possono determinare notevoli cali produttivi, con pesanti ripercussioni economiche nell'ambito dell'allevamento intensivo. Diviene allora fondamentale l'esecuzione di prove funzionali, in grado di rilevare precocemente la presenza di alterazioni dei PMNs, che richiedono l'isolamento di popolazioni altamente purificate di tali tipi cellulari. Con le metodiche tradizionalmente utilizzate i diversi tipi cellulari vengono separati in funzione della rispettiva densità. Uno dei principali problemi da affrontare deriva dal fatto che la densità dei PMNs è quasi sovrapponibile a quella dei granulociti eosinofili. Da precedenti lavori svolti su animali con patologie infiammatorie, inoltre, risultava una diminuzione della densità di una sottopopolazione di PMNs, che verosimilmente è rappresentata proprio da quelli più attivati. Scopo di questo lavoro è stato da un lato quello di ottenere livelli soddisfacenti sia di recupero che di purezza delle popolazioni di PMNs isolate, dall'altro di verificare l'ipotesi che i PMNs attivati sfuggano

all'isolamento con le tradizionali metodiche in gradiente di densità, compromettendo i risultati delle prove di funzionalità granulocitaria in condizioni patologiche. I campioni sono stati sottoposti ad esame citofluorimetrico al fine di verificare anche con tale metodica i risultati ottenuti.

Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta sui campioni ematici di 9 bovine da latte di razza frisona clinicamente sane. Dei 40 ml di sangue prelevati in EDTA da ogni soggetto, 20 ml sono stati attivati in vitro mediante aggiunta di LPS (A), mentre i restanti 20 ml sono stati utilizzati come controllo (NA). Dopo una fase di incubazione (2 ore a 37°C) sui campioni A e NA sono stati eseguiti gli esami ematologici di base. Previa centrifugazione e lisi osmotica eritrocitaria, i campioni di buffy coat (BC) e di cellule sedimentate (S) sono stati sottoposti a conta totale e differenziale, al fine di calcolare le percentuali di recupero e di purezza. I campioni S sono poi stati centrifugati su gradienti discontinui di Percoll (50% e 70%) risultati ottimali per l'isolamento dei PMNs nella fase di messa a punto della metodica. In entrambi i campioni, A e NA, sono state separate 3 bande cellulari di diversa densità: 50% (al di sopra della concentrazione minore di Percoll), 70% (tra le due concentrazioni), e Pellet (P) sul fondo della provetta. Ogni banda è stata sottoposta a conta totale e differenziale per il calcolo di recupero e purezza di ogni sottopopolazione. Per le indagini citofluorimetriche i campioni, marcati con anticorpo primario "mouse anti-bovine CD11b" e secondario "rabbit anti-mouse", hanno fornito i valori di forward scattered medio (FSC) e di mean fluorescence intensity (MFI), rispettivamente indicativi delle dimensioni cellulari e dell'espressione sulla membrana dell'integrina CD11b.

Per l'analisi statistica è stato effettuato il test t di student per confrontare A e NA, e il test ANOVA per le diverse densità (50%, 70% e P) (Statistica Stat.Soft.inc).

Risultati

Nei campioni ematici di bovino sottoposti a centrifugazione, le cellule mononucleate (monociti e linfociti) sedimentano quasi

esclusivamente in corrispondenza dell'anello di buffy coat (BC), che ne garantisce una buona separazione dalle altre classi leucocitarie. Il recupero di tale anello non è però standardizzabile, in quanto ottenuto mediante rimozione manuale dell'anello, e quindi non utilizzabile ai fini statistici. Si possono tuttavia confrontare le percentuali di purezza delle diverse classi leucocitarie nei campioni di BC e di cellule sedimentate (S) (tab.1). Nel BC, oltre ai mononucleati, è stata osservata una percentuale elevata anche di PMNs, più alta in BC.A rispetto a BC.NA, ma senza raggiungere la significatività statistica. I PMNs si comportano in modo opposto nei campioni S: in S.A la percentuale di PMNs è risultata inferiore a quella di S.NA.

Per quanto riguarda il recupero dei diversi leucociti nelle frazioni S (tab.1), i PMNs hanno fornito percentuali significativamente superiori in S.NA rispetto ad S.A e, poiché gli eosinofili sono stati recuperati in misura quasi sovrapponibile in S.NA ed S.A, in quest'ultimo campione si riscontra una maggior "contaminazione" da eosinofili; i mononucleati vengono recuperati in minima percentuale sia in S.NA che in S.A.

Per verificare la densità delle diverse popolazioni leucocitarie sono state calcolate le percentuali di recupero e purezza a livello delle bande 50%, 70% e P, dei campioni A e di quelli NA (tab.2). Sia in A che in NA la banda 50%, in cui il recupero è risultato scarso per tutte le classi leucocitarie, ha fornito percentuali di purezza di mononucleati significativamente superiori rispetto alle altre bande. La banda 70%, sia in A che in NA, ha fornito livelli di recupero e purezza di eosinofili significativamente superiori rispetto alle altre bande. In questa banda è però anche da segnalare l'elevata percentuale di PMNs riscontrabile nel campione A. I livelli di recupero e purezza di mononucleati sono risultati molto ridotti sia in A che in NA. Nella banda P, rispetto alle altre, la purezza di PMNs è risultata significativamente più elevata sia in A che in NA e il recupero di tali cellule ha mostrato valori significativamente superiori a quello delle altre bande solo nel campione NA. Nella banda P, inoltre, il recupero e la purezza di eosinofili sono risultati molto contenuti e non sono mai stati riscontrati elementi mononucleati. Per quanto riguarda le differenze tra A e NA (tab.2), nella

banda P il recupero di PMNs è risultato molto variabile e quindi non ha presentato differenze significative. La purezza di PMNs, superiore al 95% nella banda P di entrambi i campioni, nella banda 70% è risultata significativamente maggiore in A rispetto a NA. Sia il recupero che la purezza degli eosinofili sono risultati significativamente superiori nella banda 70% di NA rispetto ad A, mentre nella banda 50% e in P non sono state riscontrate differenze significative.

Anche le indagini citofluorimetriche condotte sia su campioni di sangue intero (tab.3), sia sui diversi campioni isolati (tab.4), hanno evidenziato un significativo aumento delle dimensioni cellulari (FSC) e dell'espressione sulla membrana dell'integrina CD11b nel campione A rispetto a quello NA. Le cellule più attivate sono anche quelle meno dense, in quanto risultano percentualmente sempre più rappresentate diminuendo la densità di Percoll.

recupero S	A	NA	
N	23,6 ± 14,7	47,1 ± 19,0	**
E	37,3 ± 18,9	43,2 ± 21,2	ns
M	2,8 ± 5,4	2,6 ± 4,3	ns
purezza BC			
N	53,7 ± 12,8	42,3 ± 20,4	ns
E	7,4 ± 4,6	8,8 ± 6,2	ns
M	38,9 ± 13,4	48,9 ± 19,6	ns
purezza S			
N	76,9 ± 10,2	82,1 ± 15,5	ns
E	18,6 ± 9,4	11,5 ± 8,2	ns
M	4,5 ± 4,7	6,5 ± 11,2	ns

TABELLA 1: purezza delle diverse classi leucocitarie nel Buffy Coat (BC) e loro recupero nel sedimento (S) dei campioni attivati (A) e non attivati (NA). Confronto delle percentuali di recupero delle diverse classi leucocitarie (N=neutrofili, E=eosinofili, M=mononucleati) nei campioni S e delle percentuali di purezza nei campioni BC ed S tra i campioni A e NA; ** = p<0,01.

recupero A	50	70	P	ANOVA	*	**	***
N	1,3 ± 0,8	13,3 ± 16,9	15,0 ± 17,5	ns			
E	1,6 ± 1,7	15,5 ± 12,1	4,7 ± 8,3	***	70 vs P	70 vs 50	
M	2,7 ± 2,1	3,0 ± 7,4	0,0 ± 0,0	ns			
recupero NA							
N	0,8 ± 1,0	8,1 ± 13,0	40,7 ± 32,4	**		P vs 50,70	
E	7,9 ± 18,5	34,3 ^a ± 19,5	4,7 ± 7,7	**		70 vs 50,P	
M	2,9 ± 2,3	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	***		50 vs 70	50 vs P
purezza A							
N	31,2 ± 25,3	73,0 ± 22,5	95,3 ± 8,3	***		50 vs 70	50 vs P
E	5,4 ± 6,6	26,6 ± 22,7	4,7 ± 8,3	**	70 vs 50,P		
M	63,4 ± 26,3	0,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	***			50 vs 70,P
purezza NA							
N	14,4 ± 17,2	38,0 ^b ± 30,0	98,1 ± 2,6	***			P vs 50,70
E	16,5 ± 31,4	57,5 ^c ± 27,5	1,9 ± 2,6	***		70 vs 50	70 vs P
M	69,1 ± 34,0	4,5 ± 5,8	0,0 ± 0,0	***			50 vs 70,P

TABELLA 2: recupero e purezza nelle bande 50%, 70% e P dei campioni attivati (A) e non attivati (NA). Confronto delle percentuali di recupero e purezza tra le diverse classi leucocitarie (N=neutrofili, E=eosinofili, M=mononucleati) a livello delle 3 bande di diversa densità (50%, 70% e P) e tra i campioni A e NA; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; a = p<0,05 vs A; b = p<0,01 vs A; c = p<0,001 vs A.

	FSC	MFI CD11b
A	545 ± 51	1270 ± 521
NA	416 ± 70	1010 ± 444
test t	**	*

TABELLA 3: Forward Scattered medio (FSC) e Mean Fluorescence Index (MFI) nei campioni di sangue intero. Confronto dei valori di FSC medio e di MFI ottenuti con l'indagine citofluorimetrica dei campioni di sangue intero attivati (A) e non attivati (NA); * = p<0,05; ** = p<0,01.

	FSC	MFI CD11b
50%	523 ± 94	1707 ± 832
70%	445 ± 58	1089 ± 454
P%	374 ± 66	825 ± 621
ANOVA	*** 50% vs 70%,P; **70% vs P	* 50%vs 70%,P

TABELLA 4: Forward Scattered medio (FSC) e Mean Fluorescence Index (MFI) nelle bande 50%, 70% e P. Confronto dei valori di FSC medio e di MFI ottenuti con l'indagine citofluorimetrica dei campioni relativi alle 3 bande di diversa densità (50%, 70% e P);* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001

Discussione

Qualora sia necessario ottenere una popolazione altamente purificata di PMNs, la rimozione del BC garantisce l'eliminazione quasi totale delle cellule mononucleate (monociti e linfociti), ma non risolve il problema degli eosinofili, che hanno una densità sovrapponibile a quella dei PMNs. Nel BC dei campioni attivati, inoltre, è stato possibile dimostrare la presenza di una percentuale non trascurabile di PMNs, quelli meno densi e quindi verosimilmente più attivati, che possono così essere persi utilizzando le tradizionali metodiche di isolamento cellulare.

I PMNs, che nel campione non attivato mostrano ottimali livelli sia di recupero che di purezza nella sola banda P, cioè alle densità maggiori di Percoll, nel campione attivato presentano una percentuale di purezza non trascurabile anche in corrispondenza della banda 70% (densità intermedie di Percoll). Anche con questa banda, dunque, nel campione attivato verrebbe persa una consistente frazione di PMNs.

Nel campione non attivato appaiono elevati sia il recupero che la purezza degli eosinofili nella banda 70%, che possono così essere adeguatamente separati dai PMNs. Lo stesso però non si può dire per la banda 70% del campione

attivato, in cui sia la purezza che il recupero di eosinofili sono significativamente inferiori rispetto al campione non attivato.

Nei campioni attivati, dunque, un'eventuale indagine funzionale dei PMNs condotta sulle cellule della sola banda P, meno attive e non rappresentative dell'intera popolazione, fornirebbe dei risultati falsati.

Le indagini citofluorimetriche hanno confermato i dati ottenuti con le metodiche classiche di isolamento dei PMNs: nei campioni attivati i PMNs sono meno densi, di dimensioni maggiori ed esprimono maggiormente sulla membrana l'integrina CD11b, come indicato dai valori di FSC e di MFI osservati nei campioni di sangue intero e nelle popolazioni cellulari delle 3 bande isolate.

Conclusione

Le metodiche in gradienti di densità consentono quindi di ottenere una popolazione di PMNs pura e rappresentativa solo nei campioni non attivati. In quelli attivati, e verosimilmente in condizioni di flogosi, per ottenere un maggior recupero è necessario includere anche i PMNs che migrano nella banda 70%, a scapito però della purezza. Parte dei PMNs viene comunque persa nel BC e nella banda 50%, rendendo inaffidabili i risultati ottenuti. In caso di patologie flogistiche appare quindi preferibile, per la valutazione funzionale dei PMNs, utilizzare metodiche quali quelle citofluorimetriche, che possono essere effettuate anche su sangue in toto.

Bibliografia

1. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*. 34. 597-627. 2003.
2. McClenahan DJ, Evanson OA, Walcheck BK, Weiss DJ. Association among filamentous actin content, CD11b expression, and membrane deformability in stimulated and unstimulated bovine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research*. 61(4). 380-386. 2000.
3. Smits E, Burvenich C, Guidry AJ, Roets E. In vitro expression of adhesion receptors and diapedesis by polymorphonuclear neutrophils during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Infection & Immunity*. 66(6). 2529-2534. 1998.
4. Diez-Fraile A, Meyer E, Paape MJ, Burvenich C. Analysis of selective mobilization of L-selectin

- and Mac-1 reservoirs in bovine neutrophils and eosinophils. *Veterinary Research*. 34(1). 57-70. 2003.
5. Diez-Fraile A, Meyer E, Duchateau L, Burvenich C. L-selectin and b2-integrin expression on circulating bovine polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. *Journal of Dairy Science*. 86. 2334-2342. 2003.
6. Woldehiwet Z, Scaife H, Hart CA, Edwards SW. Purification of ovine neutrophils and eosinophils: *Anaplasma phagocytophilum* affects neutrophil density. *Journal of Comparative Pathology*. 128. 277-282. 2003.

RISULTATI PRELIMINARI SULLA RISPOSTA DI FASE ACUTA IN GATTI CON SARCOMA INIEZIONE-INDOTTO

Giordano Alessia, Bonafè Katia*, Capitelli Raffaella**, Grieco Valeria*, Paltrinieri Saverio**

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

**Clinica Veterinaria San Siro, Milano

Riassunto

La flogosi è un fattore importante nella patogenesi del sarcoma iniezione-indotto felino. Inoltre sembra esistere una predisposizione individuale allo sviluppo di tali tumori, forse per una maggiore reattività infiammatoria. Scopo di tale lavoro è verificare quest'ultima ipotesi, analizzando alcuni indicatori della reazione di fase acuta nel sangue di 12 gatti con sarcoma iniezione-indotto (gruppo A), 4 gatti con altre lesioni cutanee (gruppo B) e 10 gatti di controllo (gruppo C). È stata quindi valutata la concentrazione di alcune proteine di fase acuta quali α -1-glicoproteina acida (AGP), siero amiloide A (SAA), proteina C reattiva (CRP) ed aptoglobina (Hp). Tali test sono stati effettuati prima della chirurgia, per verificare se i gatti del gruppo A fossero costitutivamente iper-reattivi, nonché a tempi diversi dopo l'exeresi, per verificare se presentassero una maggiore risposta alla flogosi post-chirurgica.

Al momento della diagnosi clinica, non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi. Nel gruppo A, però, 2 gatti presentavano livelli di AGP riferibili ad uno stato flogistico. È possibile che, a parità di istotipo, in tali animali il tumore fosse in fase di attiva evoluzione. Sia nel gruppo A che nel B, nei primi 10 giorni post-chirurgia è rilevabile un aumento della AGP, che torna alla norma nel giro di 20 giorni.

In conclusione, i gatti con sarcoma iniezione-indotto non sembrano avere una reazione di fase acuta più intensa rispetto agli altri. Ciò non esclude che localmente la loro reattività sia maggiore. Il riscontro di alcuni animali con AGP elevata, forse in relazione allo sviluppo del tumore, induce ad approfondire tale aspetto.

Parole chiave: Sarcoma iniezione-indotto, infiammazione, leucocitosi, reazione di fase acuta, AGP.

Summary

Preliminary results about the acute phase response in cats with injection-site sarcoma.

Inflammation is involved in the pathogenesis of injection-site feline sarcoma. Moreover, an individual predisposition for these tumours has been reported, most likely due to a higher inflammatory reactivity. Aim of this work is to verify the latter hypothesis, by analysing some indicators of the acute phase reaction in blood from 12 cats with injection-site sarcoma (group A), 4 cats with other cutaneous diseases (group B) and 10 control cats (group C). Specifically, we evaluated the levels of some acute phase proteins such as alfa-1-acid glycoprotein (AGP), serum amyloid A (SAA), C reactive protein (CRP) and haptoglobin (Hp). These tests were performed before surgery, to identify a possible hyper-reactivity in cats from group A, and at different times after surgery, to verify a possible increased response to post-surgical inflammation in these cats.

Before surgery, no significant differences among the groups were recorded. However, AGP levels of 2 cats from group A were consistent with inflammation. Histology did not evidenced a particular hystotype in these cats, but it is possible that tumours were actively growing at time of sampling. Both in group A and B, AGP increased in the first 10 days after surgery, then it returned to baseline levels within 20 days.

In conclusion, the acute phase reaction in cats with injection-site sarcoma is not increased. This does not exclude that, local inflammation is more intense in these cats. The detection of high AGP levels in some cats, probably related to tumour growth, suggests to further investigate this aspects.

Key Words: Injection-site sarcoma, inflammation, leukocytosis, acute phase reaction,

AGP.

Introduzione

Il sarcoma felino iniezione-indotto (VAFS) è una neoplasia mesenchimale che si sviluppa nel sottocute delle sedi anatomiche comunemente utilizzate, nella specie felina, per la somministrazione di vaccini ed altri farmaci iniettabili. Si tratta di una neoplasia molto invasiva localmente, ma con un ridotto potenziale metastatico. Istologicamente il VAFS è caratterizzato da elevato polimorfismo cellulare, dalla necrosi centrale più o meno estesa e dalla presenza di infiltrati linfocitari che possono essere limitati a follicoli di dimensioni ridotte, ma che possono anche estendersi alla periferia a circondare quasi completamente la lesione.

L'eziopatogenesi di questa neoplasia presenta ancora molti aspetti oscuri, ma è opinione comune che la flogosi vi giochi un ruolo centrale⁴. Quest'ipotesi è suffragata da diversi riscontri: in seguito all'inoculazione di vaccini si osserva spesso la formazione di granulomi nelle sedi di iniezione; durante i processi infiammatori si generano radicali liberi dell'O₂, potenzialmente mutageni, che possono danneggiare il DNA delle cellule adiacenti, e vengono rilasciati citochine e fattori di crescita, che possono favorire la proliferazione delle cellule danneggiate. Infine, sono stati segnalati sarcomi in sedi anatomiche precedentemente interessate da lesioni traumatiche¹. E' inoltre probabile che i gatti che sviluppano questa neoplasia presentino una predisposizione individuale. A dispetto dell'elevatissimo numero di gatti sottoposti a vaccinazione, l'incidenza di questa patologia è relativamente bassa (un caso su 1000); inoltre i gatti colpiti dal VAFS sono mediamente più giovani, rispetto ai soggetti colpiti da altri tipi di sarcoma, suggerendo una predisposizione genetica allo sviluppo di tali tumori; infine è stato osservato come il periodo di latenza tra il momento della vaccinazione e lo sviluppo della neoplasia sia piuttosto breve, indicando che in questi soggetti la proliferazione tumorale è accelerata. Lo scopo di questo lavoro è proprio quello di verificare se la suscettibilità individuale a sviluppare il VAFS risulta correlata ad una maggiore reattività infiammatoria.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 28 gatti, suddivisi in tre gruppi: gruppo 1: 12 gatti sani di controllo; gruppo 2: 12 gatti con VAFS; gruppo 3: 4 gatti con lesioni cutanee diverse dal VAFS (pannicolite, basalioma, schwannoma e tricoblastoma). La diagnosi dei casi patologici (gruppi 2 e 3) è stata emessa mediante istologia. I gatti del gruppo 2 sono stati ulteriormente classificati sulla base dell'istotipo delle lesioni secondo cui sono riconoscibili 3 diverse varietà morfologiche di VAFS (fibrosarcoma, sarcoma polimorfo e istiocitoma fibroso maligno), nonché sulla base dell'estensione della necrosi (da + a ++++), dell'entità degli infiltrati linfocitari (da + a ++++) e dell'invasività della neoplasia ai margini della lesione (+ o -).

Su tutti i campioni di siero è stata eseguita un'elettroforesi. La concentrazione delle proteine di fase acuta (APP) è stata misurata utilizzando kit commerciali (Tridelta Ltd, Irlanda). In particolare l' α_1 -glicoproteina acida (AGP), proteina di fase acuta più importante nel gatto, è stata misurata in tutti i 28 gatti mediante immunodiffusione radiale; la siero amiloide A (SAA) è stata dosata in 20 sieri (gruppo 1 n= 12; gruppo 2 n= 6; gruppo 3 n= 2), mentre la proteina C reattiva (CRP) è stata determinata solo in 6 gatti del gruppo 2 e in 2 del gruppo 3. Per il dosaggio di queste due proteine è stata utilizzata una metodica ELISA; la ricerca dell'aptoglobina (Hp) è stata effettuata in 17 campioni (gruppo 1 n= 12; gruppo 2 n= 4; gruppo n= 1), utilizzando una metodica colorimetrica.

I gatti patologici sono stati campionati immediatamente prima della chirurgia. Nove di essi (gruppo 2 n= 6; gruppo 3 n= 3) sono stati testati anche a tempi diversi dopo l'exeresi, allo scopo di accertare l'eventuale maggiore risposta alla flogosi post-chirurgica in gatti con VAFS. In particolare 6 gatti sono stati analizzati nei primi 15 giorni dopo la chirurgia, mentre 3 soggetti sono stati testati a non meno di 20 giorni dalla data dell'intervento, allo scopo di rilevare eventuali differenze tra la risposta flogistica acuta e la risposta tardiva.

Risultati

I risultati dell'analisi istologica e dell'analisi delle APP sono riportati nelle tabelle 1, 2 e 3. Per quanto riguarda l'esame istologico, in 7 gatti su

12 è stato diagnosticato un fibrosarcoma (FS), in 4 gatti un sarcoma polimorfo (SP), mentre un solo gatto presentava istiocitoma fibroso maligno (IFM). In 6 casi su 12 l'estensione della necrosi è risultata abbondante (+++) o molto abbondante (++++). E' emersa inoltre una certa variabilità nella quantità di linfociti presenti: in 4 casi risultavano scarsi (+), in 3 casi più numerosi (++) ed in 5 casi abbondanti (+++). Solo in 2 casi è stato possibile riscontrare invasione dei tessuti circostanti. La quantità di necrosi o di linfociti non è sembrata correlabile all'istotipo. Non sono emerse differenze significative tra i tre gruppi per quanto riguarda la concentrazione di proteine totali, di albumine e di globuline totali.

La concentrazione di α_1 - e α_2 -globuline è risultata inferiore nei gruppi patologici rispetto ai controlli. La concentrazione di γ -globuline è risultata inversamente correlata all'estensione della necrosi, nei gatti con VAFS. Per quanto riguarda la concentrazione plasmatica delle singole APP, non si sono rilevate differenze significative dei livelli di SAA tra il gruppo di controllo e gli altri due gruppi; la concentrazione di Hp era significativamente più bassa nei gatti con sarcoma, rispetto all'altro gruppo patologico; i livelli di AGP erano più bassi nei gatti patologici che nei controlli; la concentrazione di CRP non è risultata significativamente diversa nei due gruppi patologici.

TABELLA N° 1: Risultati dell'analisi istologica dei tessuti nei gatti con VAFS

N°	Istotipo	Necrosi	Linfociti	Invasività
1	IFM	+	+	-
2	FS	++++	+++	-
3	FS	+++	+++	-
4	FS	Nd	+	-
5	SP	+	+++	-
6	SP	++	++	-
7	FS	+	+	-
8	SP	+++	++	-
9	FS	++++	+++	+/-
10	FS	Nd	+++	-
11	FS	++++	++	-
12	SP	++++	+	+/-

TABELLA N° 2: Risultati relativi all'analisi elettroforetica nei diversi gruppi di gatti esaminati (Media \pm DS)

	Proteine totali (g/dL)	Albumine (g/dL)	Globuline (g/dL)	a1-glob (g/dL)	a2-glob (g/dL)	b-glob (g/dL)	g-glob (g/dL)
GRUPPO 1	7,45	3,66	3,79	0,51	0,81	0,81	1,66
	$\pm 0,82$	$\pm 0,60$	$\pm 0,83$	$\pm 0,13$	$\pm 0,39$	$\pm 0,17$	$\pm 0,59$
GRUPPO 2	7,34	3,96	3,38	0,28	0,47	0,89	3,11
	$\pm 0,77$	$\pm 0,65$	$\pm 0,59$	$\pm 0,12$	$\pm 0,18$	$\pm 0,25$	$\pm 4,26$
GRUPPO 3	7,95	4,62	3,33	0,23	0,40	0,89	1,81
	$\pm 0,44$	$\pm 0,84$	$\pm 1,05$	$\pm 0,05$	$\pm 0,18$	$\pm 0,43$	$\pm 0,55$

TABELLA N° 3: Risultati relativi alle singole APP nei diversi gruppi di gatti esaminati (Media \pm DS)

	SAA ($\mu\text{g/mL}$)	Hp x 5 (mg/mL)	AGP x 10 (mg/mL)	CRP ($\mu\text{g/mL}$)
GRUPPO 1	10,62	6,70	10,20	n.d.
	\pm 9,89	\pm 3,20	\pm 4,40	n.d.
GRUPPO 2	9,56	1,50	4,70	4,42
	\pm 6,85	\pm 0,40	\pm 5,10	\pm 2,11
GRUPPO 3	10,84	16,85	4,00	3,30
	\pm 8,46	n.d.	\pm 2,00	\pm 0,49

Discussione

I risultati dell'elettroforesi sieroproteica sembrano contrastare con la presenza di necrosi a livello delle lesioni, riscontro che dovrebbe indurre una risposta infiammatoria e quindi un aumento di α -globuline: tuttavia sia i valori dei gatti malati che quelli dei controlli rientravano nei range di normalità, quindi probabilmente il significato di queste variazioni non è patogeneticamente rilevante. Inoltre alcuni parametri (es: concentrazione di γ -globuline) erano caratterizzati da un'altissima variabilità individuale.

Per quanto riguarda le APP, stupisce il valore elevato di Hp rilevato nel gruppo 3. Va comunque sottolineato da un lato che questa proteina è stata misurata solo in un gatto del gruppo 3, e che anche i range della letteratura sono caratterizzati da una ampia variabilità individuale. Il risultato più sorprendente risulta però il riscontro di livelli di AGP significativamente inferiori nei gatti patologici che nei controlli. Va però rilevato che questi ultimi animali presentavano valori decisamente più elevati dei range di riferimento riportati in letteratura², forse in relazione al fatto che, seppur clinicamente sani e privi di altre alterazioni di laboratorio, tali animali provenivano prevalentemente da gattili, ambienti nei quali sono frequenti le alterazioni sieroproteiche, probabilmente a causa di forme infiammatorie subcliniche legate al ricircolo di patogeni a bassa virulenza^{3,5}.

L'analisi più approfondita dei risultati relativi all'AGP mostra come tutti i soggetti del gruppo 3 presentassero valori omogeneamente bassi, mentre 2 dei gatti con VAFS hanno mostrato valori più elevati anche dei range della

letteratura². Il confronto di tali dati con i reperti istologici dei due gatti sembra escludere che l'elevata concentrazione di AGP dipenda dall'istotipo, in quanto si trattava dell'unico gatto con IFM (non confrontabile con altri con lo stesso istotipo) e di un gatto con SP, istotipo frequente anche in animali con AGP bassa. Sebbene non si possa escludere che questi due gatti fossero costitutivamente iper-responsivi, altri fattori, quali lo stadio evolutivo del tumore, facilmente inquadrabili in oncologia sperimentale ma difficilmente determinabile in studi di campo quali il nostro, sono probabilmente responsabili di tale aumento.

Le analisi ripetute mostrano che, ad esclusione di un soggetto che presentava già inizialmente valori elevati di AGP, gli altri gatti con VAFS mostrano una risposta infiammatoria post-chirurgica sovrapponibile a quella dei gatti con altre patologie ed a quella riportata in letteratura per gatti sottoposti a chirurgia². Ciò sembrerebbe confermare che questi soggetti non siano più responsivi degli altri alla flogosi.

Conclusioni

Con l'eccezione di pochi soggetti, nei quali i livelli di AGP sono risultati elevati, probabilmente in relazione con la fase di sviluppo del tumore, i gatti con VAFS non mostrano una risposta di fase acuta più intensa, rispetto ad animali sani o con altre patologie. Tuttavia l'aumento della concentrazione delle APP, riflette solo la risposta sistemica ad uno stimolo flogistico, quindi non possiamo escludere che nei soggetti con VAFS si possa manifestare una maggiore reattività locale, da indagare con metodi diversi, quali ad esempio

la determinazione immunostochimica delle APP nelle lesioni.

Bibliografia

1. Fry PD, Jukes HF. (1995) Fracture associated sarcoma in the cat. *J Small Anim Pract* 36(3):124-6
2. Kajikawa T et al. (1999) Changes in concentrations of serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol* 68: 91-98.
3. Kristensen F, Barsanti J. (1977) Analysis of serum proteins in clinically normal pet and colony cats, using agarose electrophoresis. *Am J Vet Res* 38: 399-402.
4. Macy DW, Hendrick MJ. (1996) The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26(1):103-9.
5. Paltrinieri S et al. (2002) Laboratory changes consistent with feline infectious peritonitis in cats from multicat environments. *J Vet Med A* 49(10):503-10.

STUDIO SULLA RISPOSTA IMMUNITARIA DI SUINETTI VACCINATI CONTRO PRRSV ED INFETTATI CON CEPPLO ITALIANO ETEROLOGO

Paolo Borghetti¹, De Angelis Elena¹, Cordioli Paolo², Alborali Loris G.², Lombardi Guerino², Gozio Stefano³, Corradi Attilio¹, Martelli Paolo¹

¹Dip. di Salute Animale, Università di Parma; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Brescia; ³Intervet Italia – Milano.

Riassunto

18 suinetti di 28 giorni di età, divisi in tre gruppi (A, B and C), sono stati vaccinati contro PRRSV con ceppo MLV-EU (Porcilis PRRS – Intervet B.V.) per via i.m. (A) e i.d. (B) mentre il gruppo C non è stato vaccinato. Dopo 35 giorni, tutti i gruppi sono stati infettati con un ceppo di campo appartenente al cluster italiano e scarsamente correlato col ceppo vaccinale. A tutti i suinetti è stato prelevato il sangue a 3, 7, 10, 13 e 17 giorni dopo l'infezione (d.p.i.) ed a tutti i tempi sperimentali sono stati effettuati gli esami virologici su siero e le indagini citometriche per le sottopopolazioni di linfociti T e i monociti (CD4+, CD8+, CD4+CD8+ e CD14+). Durante il periodo dell'infezione è stata osservata una minore titolazione di infettività ed una maggiore risposta anticorpale nei gruppi vaccinati/infettati (A e B) rispetto al gruppo non vaccinato/infettato (C). Durante la prima settimana post-infezione è stata osservata una transitoria diminuzione dei CD4+ in tutti i gruppi ma negli animali vaccinati tali livelli si mantenevano più elevati per tutto il periodo p.i.; ciò indica una minor necessità di cellule da richiamarsi in sede di attivazione primaria nei tessuti linfoidi in seguito alla stimolazione antigenica. Le cellule CD14+ mostravano negli animali vaccinati livelli più bassi a 3 d.p.i. e un minore reclutamento tissutale a 7 d.p.i.; questo potrebbe rappresentare un più limitato afflusso di monociti e macrofagi a livello broncoalveolare come espressione di una più efficiente e controllata attivazione della risposta infiammatoria ed innata all'antigene virale eterologo. In conclusione, la vaccinazione appare determinare una ridotta infettività del challenge da virus eterologo ed i risultati sull'andamento della risposta immune possono essere interpretate come una maggiore efficienza nell'attivazione di una risposta innata.

Parole chiave: PRRSV, infezione, vaccinazione, sottopopolazioni linfocitarie periferiche, suinetti.

Summary

Study on immune response of piglets vaccinated against PRRSV and infected with an italian-like heterologous strain. Eighteen 28 day-old PRRS negative pigs, divided in three groups, were vaccinated with a PRRSV vaccine MLV – EU strain (Porcilis PRRS – Intervet B.V.) intramuscularly (A) and via intradermal route (B). Group C was kept unvaccinated. 35 days post vaccination, all groups were challenged with an Italian-like PRRSV field strain highly unrelated to the vaccine virus. Piglets were bled on 3, 7, 10, 13 and 17 days post-infection (dpi). On Day 7 two pigs per group has been euthanized and on day 17 all pigs were necropsied. Virological exams in serum and in tissues serum and flow cytometry for T lymphocyte subpopulations (CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD14+) were performed at the experimental points. After a transient reduction within the first week the CD4+ cells maintained higher levels in vaccinated animals than control group and this could be explained as more efficient cell recruitment for primary activation against heterologous antigen. In vaccinated animals we also observed a lower blood production of CD14+ at 3 d.p.i. and a lower recruitment at 7 d.p.i.; this could be explained as a limited influx of new monocytes and macrophage in bronchoalveolar spaces testifying for a more efficient and controlled activation of inflammatory and innate response. The observed differences in lymphocytes subsets between groups should be explained as a more efficient activation of innate response against the heterologous virus in vaccinated animals.

Key words: PRRSV, infection, vaccination, peripheral lymphocyte subpopulations, piglets.

**ADESIONE E RISPOSTA ADATTATIVA CELLULE OSTEOLAST-LIKE (SAOS-2)
CRESCIUTE SU SUPERFICI DI TITANIO DIVERSAMENTE TRATTATE**

¹Borghetti Paolo, ¹De Angelis Elena, ²Caldara Gaetano, ¹Corradi Attilio, ¹Cabassi Enrico, ¹Cacchioli Antonio, ¹Gabbi Carlo.

¹Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, ¹Sezione di Anatomia degli Animali di interesse veterinario, Dip. di Salute Animale ²Sezione di Anatomia Umana, Dip. di Anatomia Umana, Farmacologia e Medicina Forense - Università degli Studi Parma.

Riassunto

Cellule osteoblastic-like (SaOS-2), sono state fatte crescere su tre differenti tipi di superficie di Ti-6Al-4V (T1: non modificata; T2: modificata con trattamento chimico; T3: modificata con trattamento elettro-chimico). Indagini condotte al SEM hanno evidenziato che le cellule cresciute su T1 e T2 appaiono ben adese ed appiattite già dopo 6h con tipica morfologia poligonale, dopo 24h iniziano a confluire creando aree di monostrato che tendono ad occupare tutta la superficie entro 48h. Viceversa dopo 6h sul T3 le cellule presentano una morfologia eterogenea, sono meno adese con perdita di filopodi e protusioni citoplasmatiche ed appaiono raggrinzite con presenza di blebs e corpi apoptotici: tali aspetti di minor efficienza di adesione dopo 48h diventano meno evidenti, ed anche su T3 le cellule iniziano ad appiattirsi, ad aderire e a formare progressivamente un monostrato. E' stato inoltre evidenziato che su T3 le cellule proliferano molto più lentamente e anche dopo 7 giorni di coltura non raggiungono valori paragonabili alle altre due superfici. Il comportamento fin qui osservato sulla superficie T3 indica una maggiore difficoltà all'adesione precoce che viene nel tempo superato con adattamento delle cellule al tipo di superficie; l'analisi mediante Western Blotting non evidenzia l'induzione di proteine da stress quale l'HSP70 in nessuna delle tre superfici. Resta da dimostrare se le difficoltà di adesione delle cellule su T3 è o meno associata alla conservazione dello stato differenziato e produzione di molecole di adesione e di una matrice correttamente organizzata.

Parole Chiave: Titanio, SAOS-2, morfologia, proliferazione, HSP70.

Summary

Adhesion and adaptive response of osteoblast-like cells (saos-2) grown on different ti-6al-4v surfaces. Osteoblastic-like cells (SAOS-2) were seeded on three differently treated surfaces of Ti-6Al-4V (T1: not treated; T2: chemically treated; T3: electrochemically treated). After 6h, the cells grown on T1 and T2 surfaces showed a typical polygonal morphology, they were strongly adherent to the surface and after 24h-48h they spread and formed a confluent monolayer. On the contrary, cells seeded on T3 showed heterogeneous morphology, decreased adhesion, loss of thin cellular expansions, and showed cellular shrinkage and apoptotic blebbing; only after 48h they were able to attach and form a monolayer after 4 days of seeding. Cell proliferation was significantly lower on T3 than T1 and T2 surfaces. After 4 days of culture, the cells grown on T3 surface, recovered as adhesion efficiency and proliferation rate showing a better adaptation to the surface. Western Blotting analysis didn't reveal any HSP70 protein induction in all three surfaces. Further investigations will better analyze if this reduced early adhesion could be related to the maintenance of a cell differentiation and/or to an altered production of adhesion molecules.

Key words: Titanium, SAOS-2, morphology, proliferation, HSP70.

DISTRIBUZIONE ANATOMICA DI DESMOGLEINA 1-2 NELL'EPIDERMIDE DI CANE E GATTO: INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA

Miragliotta Vincenzo, Coli Alessandra*, Podestà Adriano*, Ricciardi Maria Paola*, Abramo Francesca**

*Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria – Università degli Studi di Pisa

°Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti – Università degli Studi di Pisa

Riassunto

La desmogleina 1 (Dsg), glicoproteina transmembrana dei complessi di giunzione desmosomiali, è antigene target di auto-anticorpi in corso di pemfigo foliaceo. Nel cane e nel gatto la malattia si manifesta clinicamente con pustole su canna nasale, aree perioculari, padiglioni auricolari e cuscinetti plantari. Nel gatto sono colpite in modo peculiare anche le zone pericapezzolare e periungueale. Per verificare l'ipotesi che la differente localizzazione anatomica delle lesioni possa corrispondere a una peculiare distribuzione della Dsg nelle due specie, sono state selezionate diverse aree cutanee del cane e del gatto e sui campioni di tessuto sono state condotte indagini di immunostochimica. È stato utilizzato un anticorpo monoclonale del commercio diretto verso un epitopo condiviso in Dsg1 e 2 di bovino, sulla base dell'evidenza di una forte omologia di struttura primaria fra le Dsg1 di bovino, uomo e cane (86-88%) e assumendo che l'omologia si estenda anche alla Dsg1 di gatto, la cui sequenza aminoacidica è tuttora ignota. Su tutte le sezioni di tessuto di cane e gatto è stata rilevata positività intercellulare con distribuzione lineare e a spot. Nonostante alcune differenze dovute al diverso spessore dell'epidermide, non sembra esistere una differente distribuzione della Dsg1-2 nelle diverse zone anatomiche. Altri fattori come la vascolarizzazione, il rapporto tra la presenza della Dsg1, Dsg3 e altre proteine del complesso desmosomiale nelle diverse aree dell'epidermide, potrebbero giustificare quindi la differente "conformazione" clinica della malattia nelle due specie.

Parole chiave: Cane, desmogleina, gatto, immunostochimica, pemfigo.

Summary

Desmoglein 1-2 distribution in canine and feline epidermis: an immunohistochemical study. Desmoglein 1 (Dsg), a desmosomal glycoprotein, is the target of autoantibodies in pemphigus foliaceus (PF). In dogs and cats, clinical lesions show a distinct anatomical distribution. In canine PF subcorneal pustules are predominantly localized on the bridge of the nose, ears, periocular areas and footpads. In feline PF, the periungueal and the perinibble areas are characteristically affected also. This finding suggests that there could be a different anatomical distribution of Dsg1 explaining the different clinical distribution of lesions. To test this hypothesis we selected distinct body areas from canine and feline skin, including those that are usual target of the disease. We evaluated Dsg distribution in immunohistochemical experiments by using a mouse monoclonal IgG1 raised against a shared epitope of bovine Dsg1 and 2, on the basis of the evidence of strong homology in the primary structures of bovine, human and canine Dsg1 (86-88%) and by assuming that homology is conserved in feline Dsg1, whose aminoacidic sequence is still unknown. Immunohistochemical staining on canine and feline epidermis always gave a positive reaction with some topographic differences, only related to the epidermal thickness. These results show that the topographic distribution of Dsg1-2 is rather uniform in the epidermis of dogs and cats in different locations. To explain the distribution of the clinical lesions, other hypotheses, instead of differences in antigen distribution, remain therefore to be validated. The particular vascular supply in different anatomical locations and/or the different quantitative ratio between Dsg1 and Dsg3 and other desmosomal glycoproteins may indeed play a role in the localisation of skin lesions.

Keywords: Cat, desmoglein, dog, immunohistochemistry, pemphigus.

EFFETTI DI UNA RAZIONE CONTAMINATA DA FB1 SULLA RISPOSTA IMMUNITARIA IN LATTONZOLI

Miduri Francesca, Passeri Benedetta, Anna Maria Cantoni, Dorigoni Vittorio, Cabassi Enrico

Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Patologia Generale e anatomia Patologica, Università degli Studi di Parma

Riassunto

Gli AA. hanno effettuato indagini volte a valutare il comportamento della risposta immunitaria cellulo mediata, (CD4, CD8 e CD14) in lattonzoli poliibridi alimentati per 42 giorni con una razione contaminata con 30ppm di FB1 in comparazione ad altrettanti soggetti di controllo della stessa età e appartenenza genetica.

Nelle indagini svolte, oltre alla grave deplezione monocitaria, si è evidenziato anche un significativo decremento delle sottopopolazioni linfocitarie CD4 e CD8 nei suinetti intossicati rispetto ai soggetti controllo.

Gli AA. hanno ragione di ritenere che i soggetti intossicati, sul piano della risposta difensiva dell'organismo, abbiano una maggior compromissione funzionale delle cellule immunocompetenti e quindi siano più suscettibili all'acquisizione d'eventuali patologie infettive e possano rispondere a trattamenti vaccinali in modo non appropriato.

Il meccanismo responsabile della contemporanea diminuzione delle cellule CD4, CD8 e CD14 nei lattonzoli intossicati da fumonisinina non è facile da chiarire. È verosimile che tale congiunto declino possa essere imputato sia ad un'azione diretta della FB1, in grado di indurre gravi ed estesi fenomeni di apoptosi e necrosi a livello dei tessuti linfomonocitopoietici, ovvero sia da riportare alla redistribuzione delle cellule linfocitarie e monocitarie in differenti organi o tessuti, come riscontrato dagli AA. , istologicamente, in analoghe loro ricerche e come segnalato nell'uomo in corso di HIV.

Parole chiave: fumonisin B1, suino, sottopopolazioni linfocitarie, immunità cellulo-mediata.

Summary

Effects of a single Fumonisin B1 (FB1) contaminated feed ration on piglets immune response. It was investigated the immune response (lymphocytes subpopulations CD4+ and CD8+, and monocytes) in polihybrid piglets feeded with a 30 ppm of FB1 contaminated ration for 42 days in comparison with the same number of control same aged subjects born in the same genetic group.

It was highlighted that monocytes population was seriously compromised and also that CD4 and CD8+ subpopulations were significantly decreased in intoxicated piglets in comparison to control ones.

The AA. think that FB1 exposed piglets have a compromised cell mediated immune response, so they seem to be more susceptible to infectious agents and less responsive to vaccinations.

The mechanism of the contemporary decrease of the number of CD4, CD8 and CD14 + cells in FB1 exposed piglets is still not well understood. Perhaps this could be caused by a direct action of FB1, that induces serious and extended apoptosis and necrosis in lympho and monocytopoetic tissues. This affects the redistribution of lymphocytes and monocytes in tissues and organs, that is confirmed histologically by the authors (unpublished data), and observed in humans HIV positive.

Key words: fumonisin B1, pig, Lymphocytic subpopulations, cell-mediated immunity.

IL “GIRO D’ISPEZIONE DELLE CARNI”: NUOVA PROPOSTA DIDATTICA PER L’INSEGNAMENTO DELL’ISPEZIONE CARNI

*Ferretto Giulia**, *Possenti Elisa***, *Monaci Marzia****, *Perniceni Livio*****, *Scanziani Eugenio******

* I° classificata del “Giro d’Ispezione delle Carni”, anno accademico 2000-01

** I° classificata del “Giro d’Ispezione delle Carni”, anno accademico 2001-02

*** I° classificata del “Giro d’Ispezione delle Carni”, anno accademico 2002-03

**** I° classificato del “Giro d’Ispezione delle Carni”, anno accademico 2003-04

***** Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano

Riassunto

Nel presente lavoro vengono esposti i risultati di un programma didattico innovativo dedicato all’insegnamento dell’ispezione delle carni. Tale programma consiste nel proporre, settimanalmente, una immagine relativa ad un reperto patologico macroscopico di un organo di animali da macello: gli studenti hanno 10 minuti per rispondere con un compito scritto a domande preordinate. I compiti vengono corretti e valutati: alla fine del corso i punti raccolti da ogni studente vengono trasformati in bonus che incrementano la votazione finale dell’esame. Nei 3 anni della sua sperimentazione il “Giro di Ispezione” ha coinvolto gli studenti in un clima di fattivo agonismo didattico sviluppando la capacità interpretativa nei riguardi dei reperti patologici per la formulazione di un corretto giudizio ispettivo.

Parole chiave: anatomia patologica, ispezione delle carni, didattica

Summary

The “Tour of Meat Inspection”: a new didactic approach for teaching meat inspection. Veterinary pathology represent an essential subject in the practice of meat inspection. During the last 3 years a new didactic approach for teaching meat inspection has been developed at the Faculty of Veterinary Medicine of Milano. Each week a new case is proposed to the students. The case is presented as a picture of an organ with gross lesions from a slaughtered animal. Students are asked to answer in a written form about the description of the lesions, the morphological diagnosis, the differentials, the etiology, the pathogenesis, the appropriate laboratory tests to confirm the diagnosis and the final judgement of

the meat based on the current laws. This new didactic proposal has been greatly appreciated by the students. They were motivated to improve they knowledge on veterinary pathology applied to meat inspection and on all other related subject for a correct interpretation of pathological findings of interest in the field of meat inspection.

Key words: veterinary pathology, meat inspection, teaching

Introduzione

L’ispezione sanitaria delle carni si affida in larga misura all’esame anatomo patologico degli organi degli animali da macello nell’identificare alterazioni che possano indicare la non salubrità delle carni. Naturalmente il veterinario ispettore, nell’esprimere il suo giudizio, deve tener conto, oltre che degli aspetti anatomo patologici, di una serie di altri dati così come delle indicazioni di tipo normativo.

Durante gli ultimi 3 anni accademici è stato sviluppato, nell’ambito del corso di ispezione degli alimenti di origine animale, un programma didattico innovativo dedicato all’insegnamento dell’ispezione delle carni.

Scopo del presente lavoro è una descrizione di tale programma didattico e una sua valutazione.

Materiali e Metodi

Settimanalmente, durante la lezione, viene proiettata una immagine relativa ad un reperto patologico macroscopico di un organo di animali da macello: gli studenti hanno 10 minuti per rispondere con un compito scritto a domande preordinate che in genere consistono nel riconoscimento dell’organo e della specie animale, nella descrizione delle lesioni, nella

diagnosi morfologica, nella diagnosi di patologia, nella diagnosi differenziale, nell'eziologia, nella patogenesi, negli ulteriori esami atti a confermare la diagnosi e, in conclusione, nel giudizio ispettivo sulla destinazione delle carni. Talvolta possono essere richieste altre informazioni quali ad esempio il nome della patologia, la diagnosi differenziale e i fattori predisponenti.

A titolo di esempio viene riportato un singolo caso.

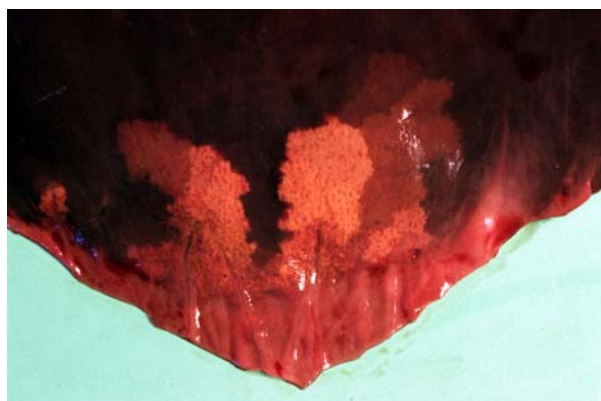


Figura 1. Fegato di equino.

In Fig. 1 è riportata una delle immagini macroscopiche proposta agli studenti. Di seguito sono riportate le domande (sottolineate) e le risposte attese sulla base delle conoscenze acquisite nel corso di Anatomia Patologica Veterinaria e di Ispezione delle carni (Guarda e Mandelli, 2002; Scanziani e Stella, 2001).

Descrizione delle lesioni

Un'area marginale di fegato, in superficie di sezione, mostra un colore giallastro. L'area ha confini frastagliati e netti (a carta geografica).

Diagnosi anatomo-patologica

Grave steatosi infiltrativa localmente estesa.

Diagnosi di patologia

Infarto adiposo.

Eziologia, patogenesi e fattori predisponenti

Stiramento da parte di legamenti o briglie aderenziali capsulari > stiramento con stenosi dei vasi delle aree di parenchima epatico sottostanti > ipossia > danno epatocitario > steatosi ipossica.

Fenomeni di rapido dimagrimento con diminuzione della massa di grasso endoaddominale (così come il parto) possono favorire l'insorgenza della patologia per l'aumentata mobilità del fegato non più mantenuto in sede da una adeguata pressione endoaddominale.

Ulteriori esami

Verifica della presenza e natura di aderenze peritoneali e dello stato di nutrizione (esclusione cachessia).

Giudizio ispettivo

Semplice asportazione della parte lesa in assenza di altre patologie (vedi ulteriori esami).

La restante parte della lesione viene utilizzata per discutere collegialmente il caso. I compiti vengono corretti, valutati con un punteggio da 0 a 100 e quelli con punteggio maggiore o uguale a 50 vengono considerati positivi. I punti vanno a formare una classifica (con tanto di "maglia rosa") che viene aggiornata settimanalmente. Alla fine del corso i punti raccolti da ogni studente vengono trasformati in bonus che incrementano la votazione finale dell'esame.

Caso	n° compiti	n° compiti positivi (%)
Tubercolosi epatica, suino	58	26 (45)
Pleuropolmonite, suino	88	56 (64)
Polmonite apostematosa, bovino	83	74 (89)
Rinite atrofica, suino	79	60 (76)
Infarto renale, bovino	67	49 (73)
Glomerulonefrite, bovino	74	68 (92)
Stasi splenica, equino	59	48 (81)
Peste suina linfonodo, suino	56	41 (73)

Tabella I - Schema riassuntivo della frequenza e successo al "Giro di Ispezione" - anno accademico 2003-2004.

Studente	voto compito	Punti "Giro di Ispezione"	voto totale
A Luigi	-	550	-
A Elena	46	85	23
B Elena	-	380	-
B Paola	46	445	26
B Nicole	46	150	24
B Marta	39	130	21
C Luca	46	400	25
C Carolina	51	430	28
C Matteo	56	840	30 Lode

Tabella II - Voto della prova in itinere, punti accumulati durante il "Giro di Ispezione" e punteggio totale.

NB: il voto del compito è espresso in /60; i punti del "Giro di Ispezione" danno un punteggio aggiuntivo di: 1/30 se > di 100; 2/30 se > di 300; 3/30 se > di 500; 4/30 se > di 700; 5/30 se > 900); gli studenti segnalati in grassetto non devono fare la prova pratica.

Risultati, discussione e conclusioni

In tabella I vengono riportati i casi proposti nell'anno accademico 2003-2004 con i dati relativi al numero di studenti che hanno consegnato il compito e il numero dei compiti considerati positivi.

In tabella II viene riportato un fac simile di classifica finale relativa all'anno accademico 2002-2003.

Nei 3 anni della sua sperimentazione il "Giro di Ispezione" ha coinvolto gli studenti in un clima di fattivo agonismo didattico. Ha sviluppato la loro capacità interpretativa nei riguardi dei reperti patologici e la capacità di integrare e collegare i dati di tipo morfologico, eziologico, patogenetico, diagnostico e legislativo nella formulazione di un

corretto giudizio ispettivo. Ha stimolato la frequenza attiva al corso rendendo interessante una materia (attività professionale) spesso considerata noiosa ed abituando gli studenti ad esprimersi in forma scritta scientificamente corretta.

Bibliografia

1. Guarda F., Mandelli G. (2002) Trattato di Anatomia-patologica Veterinaria. III ed., UTET, Torino.
2. Scanziani E., Stella S. (2001) Manuale di ispezione e controllo delle carni. MG Print on Demand, Bergamo.

**RILIEVI NECROSCOPICI, ESAMI CITOLOGICI, ISTOLOGICI E
DETERMINAZIONE DEI METALLI PESANTI E ARSENICO IN TARTARUGHE
MARINE (CARETTA CARETTA) SPIAGGIATE IN EMILIA-ROMAGNA**

*Merendi Flavia*¹, *Zaccaroni Annalisa*¹, *Zucchini Marina*¹, *Affronte Marco*², *Scaravelli Dino*², *Simoni Paolo*¹

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria -
Università di Bologna

² Fondazione Cetacea - Riccione - Rimini

Riassunto

Su 11 tartarughe marine (*Caretta caretta*) spiaggiate lungo il litorale dell'Emilia-Romagna (Ravenna, Forlì-Cesena, Rimini) sono stati eseguiti rilievi necroscopici. Da tali soggetti, compatibilmente con lo stato di conservazione, sono stati allestiti preparati citologici e istologici. Sono state inoltre effettuate indagini tossicologiche per metalli pesanti (Cd, Cr, Hg, Pb e Se) e arsenico su fegato, rene, cuore, muscolo e osso.

In alcuni soggetti sono state riscontrate fratture multiple dell'osso occipitale e del piastrone. Inoltre, infissi a tutto spessore nell'esofago, sono stati trovati tre ami da palamiti in altrettanti animali

Le indagini necroscopiche hanno messo in evidenza lesioni simili in tutti i soggetti. In particolare, il fegato risultava friabile anche applicando una moderata pressione. I polmoni erano collassati e talvolta congesti. Si notava una lieve splenomegalia e i reni apparivano di forma e volume normali e talvolta congesti. Il tessuto adiposo si presentava poco abbondante e si rilevavano edemi emorragici generalizzati in quasi tutti gli animali. Inoltre, a livello del grasso delle articolazioni, era presente materiale purulento.

Le indagini istologiche hanno evidenziato steatosi epatica diffusa. A carico del polmone è stata osservata congestione e stasi ematica. Nella milza si sono rilevate aree di necrosi, presenza di formazioni cistiche e nubecole di batteri. Nei reni si sono riscontrati stati degenerativi a livello di diversi glomeruli con depositi calcifici, formazioni batteriche in forma "cistica", fra l'altro osservabili anche in altri organi. Nel grasso, le lesioni venivano identificate come accumuli di materiale purulento all'interno di alcuni vasi sanguigni, come confermato anche dai preparati

citologici, dove si osservano cellule infiammatorie, batteri (sporigeni) e materiale necrotico.

Le osservazioni di tipo anatomo-istopatologico non consentono di correlare le lesioni riscontrate con i dati ottenuti dalle indagini tossicologiche, in quanto le concentrazioni di metalli pesanti e di arsenico reperite in tutti i soggetti sono inferiori alle soglie tossiche definite per i singoli elementi. In conclusione, il monitoraggio eseguito su *Caretta caretta* dimostra che l'ambiente marino in cui questi animali vivono non presenta livelli di inquinamento tali da portare all'accumulo di metalli pesanti ed arsenico nei tessuti e che quindi le manifestazioni patologiche riscontrate sono da ascrivere a noxae di origine biologica.

Parole chiave: tartarughe marine, *Caretta caretta*, patologia, tossicologia e ambiente.

Summary

Necroscopic, cytologic, histologic findings and toxicologic determination of heavy metals and arsenic in sea turtles (*Caretta caretta*) stranded in Emilia-Romagna. Anatomo-pathological investigations and toxicological determinations of heavy metals (Cd, Cr, Hg, Pb e Se) and arsenic were performed on 11 *Caretta caretta*. The main histo-pathological findings were indicative of degenerative lesions in the hepatic parenchyma. The presence of unclassified bacteria was a frequent finding and sometimes it was associated with an inflammatory reaction in liver, kidney and adipose tissues. The toxicological results showed low levels of heavy metals and arsenic in the tissues. The association between the inflammatory reaction in tissues and bacteria needs further investigations.

Keywords: sea turtles, *Caretta caretta*, pathology, toxicology and environment.

Introduzione

In questi ultimi anni gli animali selvatici hanno assunto una sempre maggiore importanza come monitor ambientali, in quanto essi sono strettamente legati ad un determinato ambiente. Nelle specie animali che si trovano in cima alla catena trofo-alimentare, grazie al fenomeno di bioaccumulo, è più probabile il reperimento di tassi maggiormente elevati di composti ritenuti tossici. Seppur oggetto di critiche, le opere di monitoraggio rivestono in ogni caso una rilevante importanza nello stabilire il grado di inquinamento dell'ambiente.

Nonostante possa essere condizionato da diversi fattori, il monitoraggio ambientale può fornire utili informazioni sul grado di inquinamento di un'area, con la possibilità di spunti e conclusioni suscettibili di incentivare ulteriori e più approfonditi studi al proposito (Guberti, 1995).

Per il nostro studio abbiamo preso in esame la tartaruga marina (*Caretta caretta*) come nuova specie animale per il monitoraggio ambientale in relazione anche ai rilievi patologici.

Materiali e metodi

In un periodo compreso tra luglio e novembre 2003 si sono spiaggiate 11 tartarughe lungo il litorale dell'Emilia-Romagna, comprendente le province di Ravenna, Forlì-Cesena e Rimini. Gli animali avevano una età presumibilmente compresa tra i 10 e i 20 anni. L'età è stata calcolata in base al diametro maggiore del carapace che risultava mediamente di 57,45 cm (foto 1).

Su tutti i soggetti sono stati eseguite indagini necroscopiche, citologiche, istologiche e tossicologiche.

Gli strisci, colorati con metodica di May-Grüwald Giemsa, sono stati allestiti da materiale necrotico-purulento prelevato da lesioni a carico del tessuto adiposo riscontrate in tutti gli animali. Per le indagini istologiche i campioni di organi e tessuti sono stati fissati in formalina di Carson, inclusi in paraffina, sezionati a 5µm e colorati con Ematossilina & Eosina (E&E).

Le analisi tossicologiche erano indirizzate alla ricerca di metalli pesanti (Cadmio, Cromo,

Selenio, Piombo, Mercurio) e Arsenico. Per il mercurio si è utilizzata l'analisi con generazione di idruri e l'analisi con tecnica di spettrometria di massa con sorgente al plasma (ICP-MS) per i restanti elementi.

Risultati

Le indagini necroscopiche dei soggetti, compatibilmente con lo stato conservativo, hanno messo in luce fratture a carico dell'osso occipitale in un soggetto, in un altro del frontale e del piastrone lungo la linea mediale in tre. Sono stati rinvenuti ami da palamiti infissi a tutto spessore nell'esofago in tre tartarughe e sempre nello stesso organo, in tutti i soggetti, materiale catramoso in quantità variabile che imbrattava le spicole. Tutti gli animali presentavano uno scadente stato di nutrizione. Infatti lo strato di tessuto adiposo sottocutaneo e della cavità celomatica risultava scarso. A carico del grasso sottocutaneo sono state rilevate lesioni necrotico-purulente focali di dimensioni variabili, di natura sacciforme-fistolose, contenenti un materiale bianco-verdastro caseoso (foto 2). L'esame degli organi contenuti in cavità celomatica non rivelavano alterazioni di rilevanza significativa. I polmoni erano collassati e talvolta congesti. Si notava una lieve splenomegalia e i reni apparivano di forma e volume normali e talvolta iperemici. Le alterazioni più rilevanti sono state osservate a carico del fegato, dove si poteva osservare iperemia e il parenchima risultava friabile anche applicando una leggera pressione. Gli esami citologici eseguiti sul materiale necrotico-purulento hanno messo in evidenza una popolazione di cellule infiammatorie costituite principalmente da linfociti ed eterofili e si sono osservati aggregati batterici.

Istologicamente, la lesione riscontrata nel grasso mostrava, ipertrofia del tessuto connettivo. Nel fegato si è osservato la presenza di steatosi. Alcuni epatociti mostravano vacuoli lipidici di varie dimensioni a volte riuniti in un unico vacuolo che occupava tutto lo spazio citoplasmatico, confinando il nucleo alla periferia della cellula. Inoltre, si rendeva evidente l'iperemia dell'organo (foto 3).

I dati ottenuti dalle analisi tossicologiche hanno dimostrato che gli elementi presi in considerazione nel complesso non raggiungevano

quantitativamente le soglie di tossicità. Analizzando gli elementi uno ad uno e confrontandoli fra loro, si è osservato che Arsenico, Selenio e Cadmio risultavano essere più elevati in alcuni organi rispetto ad altri, ma in ogni caso le quantità non risultavano tossiche (Graf. 1 e 2).

Per le tartarughe non esistono in letteratura valori di tossicità di riferimento e di conseguenza vengono considerati quelli di altri animali che in un qualche modo vivono in un ambiente simile (Tab 1).



Figura 1. Soggetto di tartaruga marina (*Caretta caretta*).



Figura 2. Tessuto adiposo. Lesione necrotico-purulenta. Si noti l'aspetto sacciforme-fistoloso contenente il materiale.

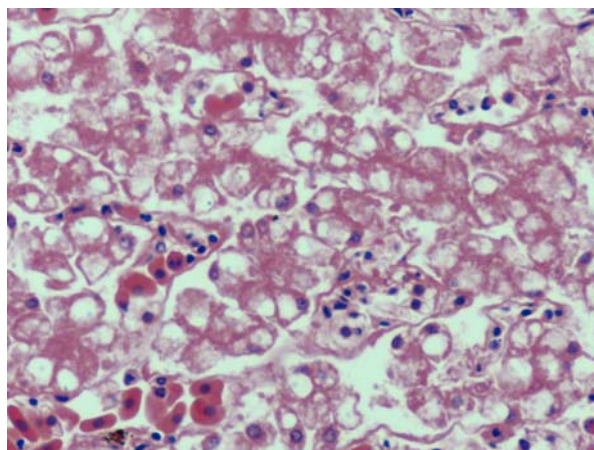


Figura 3. Fegato: steatosi e l'iperemia.

Elementi	Soglia di tossicità
Cadmio	100 ppm
Piombo	1-20 ppm
Cromo	4 ppm
Arsenico	100 ppm
Mercurio	0,01-0,5 ppm
Selenio	10 ppm

Tabella 1. Soglie di tossicità. Indici di riferimento di animali acquatici applicati alla *Caretta caretta*.

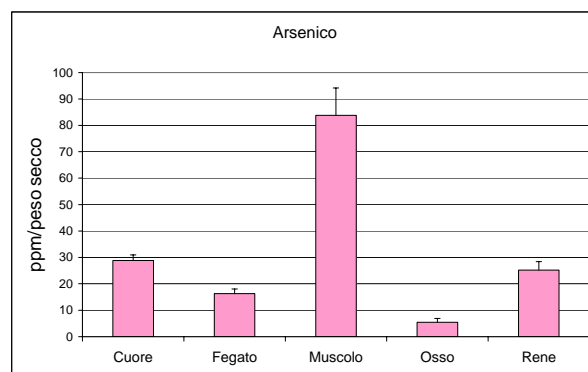


Grafico 1. Concentrazione dell'Arsenico nei vari tessuti e organi.

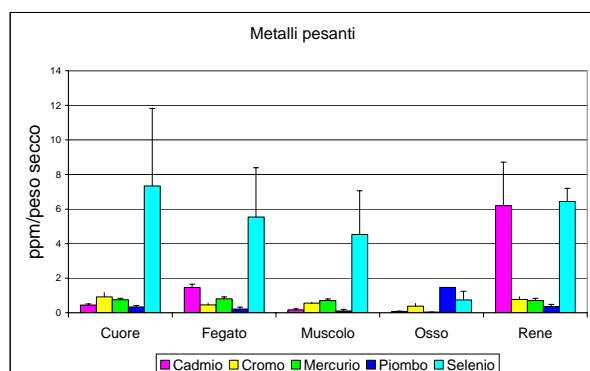


Grafico 2. Concentrazioni di Cd, Cr, Hg, Pb, Se nei diversi tessuti e organi.

Discussione

Lo scadente stato di nutrizione da noi osservato in tutti i soggetti esaminati può essere dovuto all'ingestione di materiali di diversa natura (plastiche, ecc.) che non hanno consentito agli animali di alimentarsi in maniera adeguata, partecipando così all'istaurarsi di grave patologie che possono avere portato a morte.

D'altra parte i fenomeni steatosici a livello epatico testimoniano di stati di insufficienza epatica responsabili di gravi alterazioni del metabolismo lipidico sia epatico che generale.

D'altronde non è da escludersi un certo effetto sul fegato di Arsenico, Selenio e Cadmio. Infatti i livelli di Arsenico reperiti in questo studio risultano più elevati, sebbene in accordo con quanto riportato da Storelli & Marcotrigiano (2000) e presentano un andamento residuale (muscolo > rene > fegato) analogo a quanto osservato da Sakai et al. (2000). Pur essendo sconosciuta l'esatta tossicità in questi animali, non è da escludere una certa epatotossicità legata ai livelli di Arsenico riscontrati.

Il selenio risulta essere il secondo elemento che presenta elevate concentrazioni, in particolar modo in cuore, rene e fegato (Storelli et al., 1998). In considerazione del ruolo protettivo svolto dal selenio non stupisce il fatto che organi particolarmente sensibili come il cuore siano quelli che presentano le concentrazioni più elevate del metallo.

La presenza di concentrazioni elevate di Cadmio a livello renale ed epatico rispetto ad altri tessuti è spiegabile ricordando la cinetica del metallo stesso che prevede il legame con metallotionine a livello epatico e il riassorbimento dei complessi Cd-tionine a livello del sistema tubulare renale.

Conclusioni

In conclusione si può affermare che l'ambiente marino in cui questi animali non influisce in modo determinante sulla qualità della vita. Dopo un'attenta valutazione degli elementi nelle nostre mani si può dire che non esistono correlazioni tra le concentrazioni degli elementi tossici e lo stato patologico riscontrato, valutando il tipo di alimentazione e l'età dei soggetti. In ogni caso, la morte degli animali è da imputarsi maggiormente all'impatto antropogenico che a effetti tossici dei metalli studiati.

Bibliografia

- Guberti V. (1995). Animali domestici, sinantropici e selvatici come indicatori ambientali. In VI corso "Medicina Veterinaria ed Inquinamento Ambientale". Istituto Superiore di Sanità, Roma 18-22 settembre
- Sakai H., Saeki K., Ichihashi H., Sagunama H., Tanabes S. e Tatsukawa R. (2000). Species-specific distribution of heavy metal in tissues and organs of Loggerhaed Turtle (*Caretta caretta*) and Green turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 40(8): 701-709;
- Storelli M.M., Marcotrigiano G.O. e Ceci E. (1998). Distribution of heavy metal residues in some tissue of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimen beached along the Adriatic Sea (Italy). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 546-552;
- Storelli M.M. & Marcotrigiano G.O. (2000). Total organic and inorganic arsenic from marine turtles (*Caretta caretta*) beached along the Italian coast (South Adriatic Sea). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65: 732-739.

LO XENOTRAPIANTO DI RENE DA MAIALE TRANSGENICO PER HDAF A MACACA FASCICULARIS COME MODELLO PRECLINICO: STUDIO CLINICO-PATOLOGICO IN 31 PRIMATI

Cavicchioli Laura¹, Calabrese Fiorella², Valente Marialuisa², Cozzi Emanuele³, Ancona Ermanno⁴, Castagnaro Massimo¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova - ²Istituto di Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Padova - ³Azienda Ospedaliera di Padova e C.O.R.I.T. (Consorzio per la Ricerca sul Trapianto d'Organi)

⁴Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Padova e C.O.R.I.T. (Consorzio per la Ricerca sul Trapianto d'Organi)

Riassunto. Ciclofosfamide (CYP) e Metotrexate (MTX) sono stati impiegati come parte della terapia immunosoppressiva in 31 *Macaca fascicularis* riceventi uno xenotrapianto di rene da suini transgenici per human decay accelerating factor (hDAF). Poichè l'utilizzo di questi due farmaci determina gravi effetti indesiderati nei primati, è stata effettuato un dettagliato esame anatomo-istopatologico nei 21 soggetti riceventi come terapia induttiva immunosoppressiva CYP e nei 10 soggetti riceventi MTX. A tutti i primati è stata somministrata una terapia immunosoppressiva di mantenimento costituita da ciclosporina, micofenolato di sodio e corticosteroidi. I primati xenotrapiantati hanno avuto un range di sopravvivenza compreso tra 0 e 90 giorni. Istologicamente si sono osservate lesioni soprattutto a livello del tratto gastroenterico. Nei primati trattati con CYP le lesioni riscontrate sono caratterizzate principalmente da infiltrato infiammatorio mucosale diffuso e grave, mentre nei primati trattati con MTX, i reperti sono essenzialmente dati da grave erosione della mucosa associata ad infiltrato infiammatorio linfoplasmacellulare da lieve a moderato, disseminato. Per quanto riguarda il rene xenotrapiantato si sono rilevati 2 casi di rigetto iperacuto, 24 casi di rigetto umorale acuto e 5 casi di rigetto cellulare acuto. In conclusione, le lesioni gastroenteriche sono un reperto costante quando CYP e MTX vengono utilizzati come parte della terapia immunosoppressiva induttiva nei primati riceventi xenotrapianto di rene da maiale transgenico per hDAF determinando lesioni differenti in accordo con il loro meccanismo d'azione.

Parole chiave: Ciclofosfamide; lesioni gastrointestinali; immunosoppressione; infiltrato linfoplasmacellulare; Metotrexate; primate.

Summary. Kidney transplantation from hDAF transgenic pigs to *Macaca fascicularis* as a preclinic model: clinical and pathological study in 31 primates. Cyclophosphamide (CYP) and Methotrexate (MTX) were used as part of the immunosuppressive regimen in 31 *Macaca fascicularis* receiving renal xenografts from human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs. Since the use of these drugs is reportedly associated with side-effects in primates, we undertook a detailed post mortem analysis in the animals receiving either CYP (n=21) or MTX (n=10). Primates received maintenance immunosuppression with cyclosporine A, sodium mycophenolate and steroids. The xenografted animals survived between 0 and 90 days. Severe GI side-effects were frequently observed. In CYP-treated animals GI-tract lesions were primarily characterized by diffuse, severe lymphoplasmocytic mucosal inflammatory infiltrate. In MTX-treated primates, findings were consistent with severe mucosal erosion associated with mild-to-moderate disseminated lymphoplasmocytic infiltration. In the xenografts we observed 2 cases of hyperacute rejection, 24 cases of acute humoral rejection and 5 cases of acute cellular rejection were seen. In conclusion, GI tract lesions are an early and consistent finding when CYP or MTX are used as induction agents in this model. It is worth noting, that the two compounds induce different types of GI tract damage, in agreement with their different mechanisms of action. This study indicates that immunosuppressive drugs can cause severe GI tract damage in primate recipients of renal xenografts and may be responsible for life-threatening lesions.

Key words: Cyclophosphamide; gastrointestinal lesion; immunosuppression; lymphoplasmocytic infiltration; Methotrexate; primate.

***PARTICELLE ATMOSFERICHE AMBIENTALI NEI POLMONI DEI CANI -
ASPETTI ISTOPATOLOGICI ED ULTRASTRUTTURALI***

Paciello Orlando, Russo Valeria, Maiolino Paola, Martano Manuela, Restucci Brunella, Papparella Serenella.

Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Settore di Anatomia patologica. Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Riassunto

Studi recenti hanno documentato gli effetti negativi sulla salute umana delle polveri aereo-disperse. Per capire l'azione biologica svolta da queste particelle, è importante conoscere sia la loro concentrazione, sia le dimensioni, la composizione chimica e la morfologia. Poiché la composizione chimica delle particelle sospese è condizionata da numerosi fattori ambientali è necessario intraprendere delle indagini epidemiologiche per comprendere e valutare le conseguenze sui tessuti dei differenti tipi del particolato aereo-disperso e gli effetti a lungo e a breve termine sull'organismo vivente. Sono stati esaminati polmoni e i linfonodi collettori di 30 cani vissuti a Napoli al fine di determinare la composizione delle polveri aereo-disperse, la quantità di queste nei polmoni e nei linfonodi e l'eventuale danno tissutale. Istologicamente nel polmone e nei linfonodi, particelle di colore nerastro, birifrangenti, erano stipate nel citoplasma dei macrofagi o erano libere negli interstizi. Al TEM era evidente la stretta associazione tra macrofagi attivati e fibroblasti. Al SEM, nei polmoni, si osservavano particelle elettrondense all'esterno ed all'interno degli alveoli e dilatazione dei pori di Kohn. Il materiale particolato del polmone analizzato alla microanalisi a raggi X (analisi qualitativa e semi-quantitativa) era formato da particelle di Na (3%) da S (2%), P (16%) e tracce di K, Ca, Al, Si, Cl, Ti, Fe. Percentuali maggiori di Si (4%), Al (2%), K (2,6%), Fe (1,5%) erano riscontrati nei linfonodi, Na (2%), S (1,8%), P (11%), e tracce di Ca, Cl, Ti, erano altresì evidenziabili. Dall'analisi dei risultati si ritiene che il danno osservato, anche se di lieve entità, possa derivare dalla presenza del particolato; che l'analisi qualitativa e quantitativa del particolato è fondamentale per la comprensione della patogenesi delle lesioni e per la conoscenza delle

possibili fonti di inquinamento. Questo studio potrebbe essere il punto di partenza per futuri studi epidemiologici.

Parole chiave: inquinamento ambientale, polmone, cane.

Air pollution: particulate in canine lungs - histopathological and ultrastructural findings.

The introduction of various forms of exogenous mineral material into body could be the cause of an altered tissues homeostasis.

Many epidemiologic studies have linked the presence of particulate matter (PM) air pollution with respiratory and cardiovascular diseases. Relatively little is known about the types, numbers, composition, sizes, and distribution of ambient particles potentially harmful for respiratory airways.

Since many ambient particles are colorless and/or well below the level of resolution of light microscopy, definitive evaluation of particle burden in the airways require analytical electron microscopy.

We have analysed the pulmonary tissue and bronchial lymph nodes of 30 dogs lived in Naples. The most common microscopic feature was the presence of lung and lymph nodal fibrosis associated with clusters of macrophages loaded of birefringent particles. The types, composition, and distribution of ambient particles in the airways were evaluated by a combination of energy dispersive X-ray microanalysis and scanning electron microscopy.

We concluded that domestic animals represent an important biological source of informations about the nature and origin of the mineral material from which helpful data may be obtained for assessing risks to human health and gaining new insight into pathogenetic mechanism.

Key words: air pollution, lung, dog.

Introduzione

La conoscenza degli inquinanti ambientali ed il controllo dell'esposizione ad agenti nocivi per la salute umana ricoprono un interesse prioritario in Sanità Pubblica.

Vi è però penuria di dati disponibili e le esigenze delle conoscenze epidemiologiche e delle stime di rischio non sono direttamente esaudibili dagli attuali sistemi e metodi di rilevamento.

Alla luce di queste considerazioni, da qualche tempo si sta indagando su diverse ipotesi di studio per cercare di definire in che misura gli animali domestici possono contribuire alla sorveglianza epidemiologica in campo ambientale (Paciello et al., 2002).

Abbiamo ritenuto opportuno valutare le lesioni dei polmoni, filtri biologici dell'aria respirabile, e dei linfonodi satelliti di cani che vivono in aree urbane di Napoli.

Materiali e metodi

Sono stati adoperati 30 cani vissuti a Napoli e venuti a morte spontaneamente. Dei soggetti in esame, è stata eseguito l'esame necroscopico ed effettuati prelievi, fissati in formalina neutra al 10%, di tutti gli organi; in particolare per lo studio sono stati eseguiti prelievi del polmone, dalle zone cranio-ventrali, dei linfonodi tracheo-bronchiali e mediastinici. Previa inclusione in paraffina, sezioni di 6 µm sono state colorate con l'Ematossilina Eosina, Tricromica di Masson, Verhoeff-Van Gieson (VVG), e la Weigert per le fibre elastiche. Altri campioni, degli stessi tessuti, sono stati fissati in glutaraldeide al 2,5%, post-fissati in tetrossido di osmio ed inclusi in resina epossidica di Spurr, la cui polimerizzazione è stata effettuata in stufa a 70° C per 8 ore. Sezioni di 900-1000 Å sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo. Altri campioni ancora, sono stati fissati in glutaraldeide al 2,5%, disidratati nella serie crescente degli alcoli. I campioni sono stati poi montati su stabs di carbone e ricoperti con una strato di carbone in un Polaron E 5400 sputter-coater. Alcuni campione sono stati montati su stabs di alluminio e ricoperti con uno strato d'oro.

I campioni così allestiti sono stati esaminati con un microscopio elettronico a scansione Cambridge Stereoscan 240 e tutti i campioni ricoperti di carbone, sono stati analizzati con un sistema di

microanalisi a raggi X AN 10/25 S Link X-ray.

Risultati

Macroscopicamente i polmoni apparivano disseminati di punticini di colore nerastro, che conferivano al viscere un colore grigiastro. Alcune aree apparivano di consistenza aumentata per la presenza di fibrosi. Erano spesso evidenti aree enfisematose, rigonfie, di colore rosa pallido (Figura 1). I linfonodi regionali apparivano aumentati di volume e di consistenza, mostravano una diffusa colorazione nerastra; a questo aspetto si associavano i segni di uno stato reattivo cronico con iperplasia follicolare.

Istologicamente nel polmone, particelle di colore nerastro, di aspetto cristallino, spesso birifrangente a luce polarizzata, erano stipate nel citoplasma dei macrofagi o erano libere negli interstizi, specie nel connettivo peribronchiale, nell'avventizia dei vasi. Frequentemente intorno alle polveri, si addensavano elementi cellulari linfo-monocitoidi e fibre collagene. Proliferazione di tessuto fibroso, evidenziata con la colorazione VVG era maggiormente evidente a livello peribronchiale, perivascolare, alveolo-capillare e pleurico (Figura 2).

Le altre lesioni erano rappresentate: da aspetto festonato dei lumi bronchiali i cui epitelii erano iperplastici e con aspetti di ipersecrezione, enfisema caratterizzato da fenestrature presenti nella parete degli alveoli o da distruzione completa delle pareti settali tanto che alveoli adiacenti si fondevano, formando spazi molto ampi.

Numerosi macrofagi schiumosi, ripieni di polveri nerastre, a volte rifrangenti erano osservabili sia liberi nelle camere alveolari sia come aggregati di piccole dimensioni indovati in tessuto connettivo ialino.

Nei linfonodi regionali, lo stato reattivo era espresso dalla desquamazione dei macrofagi nei seni perifollicolari. Nella midollare si rinvenivano macrofagi epitelioidei ripieni di materiale nerastro, c.d. coniofagi, che formavano accumuli particolarmente abbondanti, associati a sclerosi (Figura 3).

L'indagine ultrastrutturale condotta al TEM ha evidenziato la stretta associazione tra macrofagi attivati, fibroblasti e tessuto connettivo. Nel citoplasma dei macrofagi erano presenti

eterolisosomi, contenenti materiale elettrondenso riferibile a particelle di polvere (Figura 4).

Le fibre collagene peribronchiali, perivascolari e quelle disposte intorno agli accumuli dei macrofagi, apparivano costituite da fibrille di collagene arrangiate in fasci irregolari con un andamento spiraliforme (“spiralled collagen”) (Figura 5) e con uno spessore e periodicità della fibra aumentati. Tra le fibre elastiche erano evidenziabili fibre composte da filamenti elettrondensi interpretabili come fibre pre-elastiche o fibre di ossitalano.

Al SEM, nei polmoni, la lesione caratterizzante era rappresentata dalla presenza di particelle elettrondense negli alveoli e all'esterno di questi e dalla dilatazione dei pori di Kohn .

Il materiale particolato del polmone analizzato alla microanalisi a raggi X (analisi qualitativa e semi-quantitativa) era formato da particelle di Na (media 3%) da S (media 2%), P (media 16%) e tracce di K, Ca, Al, Si, Cl, Ti, Fe. (Figura 6).

Percentuali maggiori di Na (media 2%), K (media 2,6%), Si (media 4%), Al (media 2%), S (media 1,8%), P (media 11%), Fe (media 1,5%) e tracce di Ca, Cl, Ti, sono state rinvenute nei linfonodi collettori.



Figura 1. Cane, polmone: disseminazione della polvere nerastra nel parenchima con una caratteristica colorazione grigiastra dell'organo.

Considerazioni e conclusioni

Gli aspetti e le modificazioni strutturali osservati, pur non raggiungendo nel complesso evidenti espressioni di marcata gravità e rimanendo quasi sempre limitati e circoscritti, in definitiva però sono risultati particolarmente significativi essendo chiaramente connessi alla presenza di sostanze estranee e testimoniando pertanto una precisa

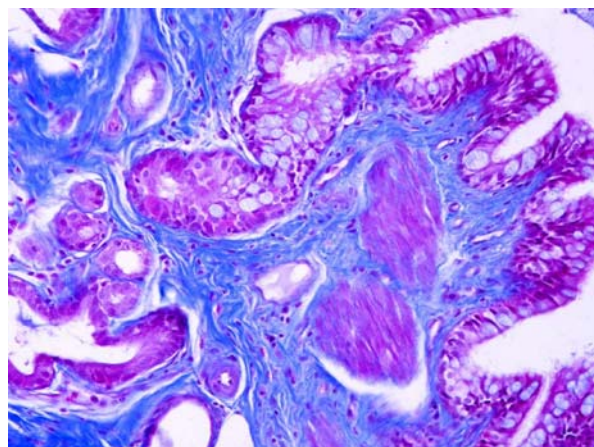


Figura 2. Proliferazione di tessuto fibroso in sede peribronchiale. Aspetti ipersecretivi dell'epitelio. Tricromica di Masson 400 X.

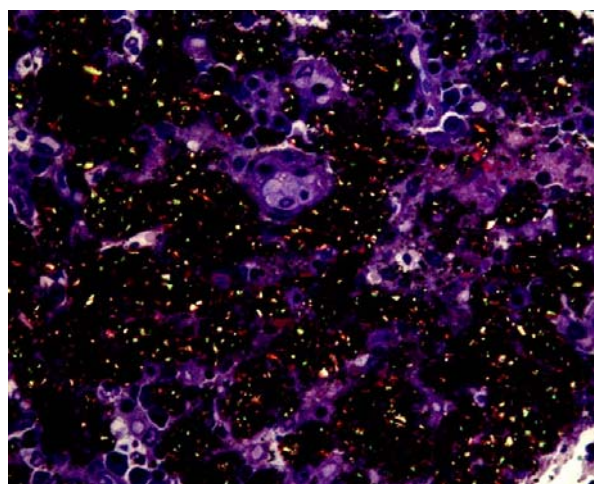


Figura 3. Coniofagi ripieni di particelle birifrangenti alla luce polarizzata, stipati nei seni della midollare. Semifine, 400X.

risposta dei tessuti polmonari e linfonodali a stimoli derivati dalla noxa.

L'aspetto più interessante delle nostre osservazioni è rappresentato dalla fibrosi peribronchiale, perivascolare, alveolo-capillare e pleurica.

Il processo fibrotico è importante per la riparazione dei tessuti, ma se eccede perché incontrollato, può alterare la struttura dell'organo e compromettere le funzioni fisiologiche. (Inoue et al., 1996; Hamada et al., 2000). La fibrosi polmonare rappresenta lo stereotipo dell'evento patologico finale conseguente ad insulti prodotti da numerosi agenti biologici, farmaci, sostanze chimiche, polveri organiche ed inorganiche, gas, fumi, vapori. Sfortunatamente, i meccanismi

patogenetici che regolano e modulano la fibrosi polmonare sono ancora poco chiari.

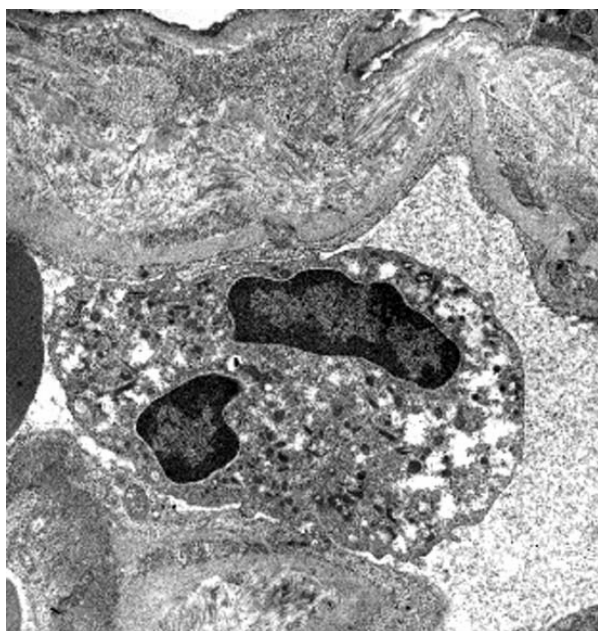


Figura 4. Macrofago tra i setti alveolari con granuli di materiale elettron-denso all'interno dei lisosomi. *T.E.M. X14500.*

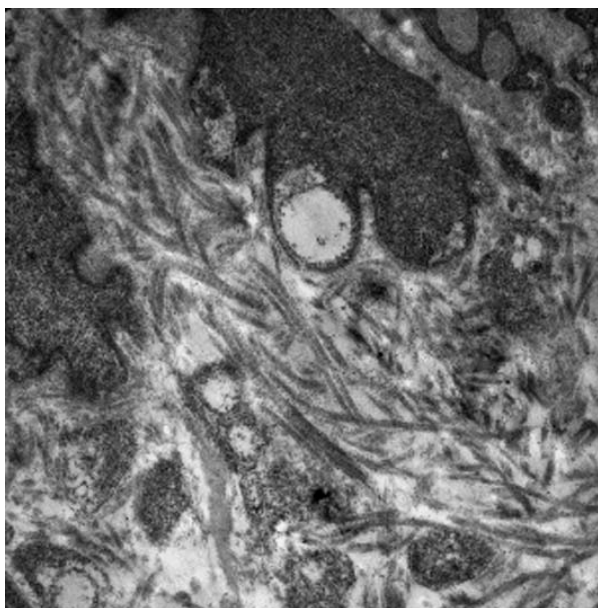


Figura 5. Disposizione irregolare delle fibre collagene con aspetti spiraliformi. *T.E.M. X34000*

Nel nostro studio, la stretta associazione tra proliferazione di tessuto connettivo e macrofagi attivati per la presenza del materiale particolato estraneo, conferma ancora una volta, sia il ruolo

centrale svolto dal macrofago nella modulazione del processo fibrogenetico ed in particolare nelle fibrosi conseguenti a polveri, sia l'importanza delle polveri aereodisperse nel determinismo di pneumopatie croniche.

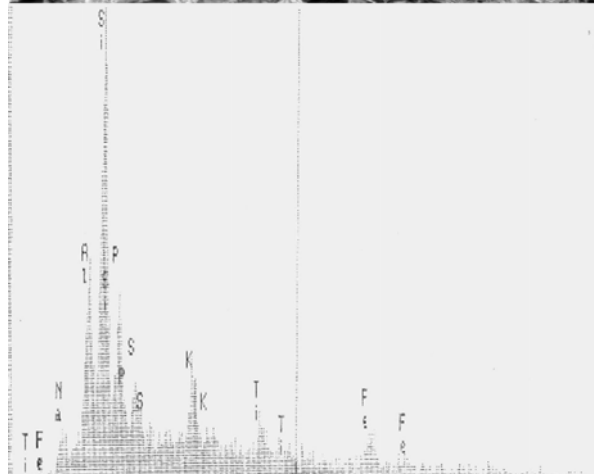
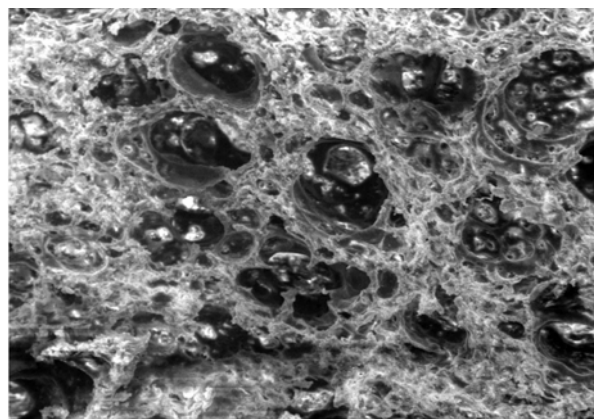


Figura 6. Particelle elettron-lucenti nelle camere alveolari e grafico relativo alla loro composizione *S.E.M. con microanalisi a raggi X.*

Inoltre ci pare interessante l'osservazione del danno al tessuto connettivo ed alla componente elastica, caratterizzato rispettivamente da un aumento dello spessore e della periodicità delle fibrille di collagene, e dalla presenza di fibre di ossitalano e di elanina, precursori delle fibre elastiche. Questi aspetti testimoniano l'elevato turn-over cui sono sottoposti il connettivo e il tessuto elastico e dimostrano che le polveri, esercitando un'azione persistente, non permettono un corretto assestamento dei tessuti.

Un altro dato che deve essere chiarito è la differenza di concentrazione della polvere rinvenuta nei linfonodi rispetto a quella del

polmone. Il materiale particolato del polmone analizzato alla microanalisi a raggi X (analisi qualitativa e semi-quantitativa) era formato da particelle di Na (media 3%) da S (media 2%), P (media 16%) e tracce di K, Ca, Al, Si, Cl, Ti, Fe. Percentuali maggiori di Na (media 2%), K (media 2,6%), Si (media 4%), Al (media 2%), S (media 1,8%), P (media 11%), Fe (media 1,5%) e tracce di Ca, Cl, Ti sono state rinvenute nei linfonodi collettori.

Queste differenze di concentrazione di particelle nei linfonodi rispetto al polmone, potrebbero essere spiegate con il fatto che la polvere inalata viene speditamente convogliata nei linfatici, attraverso le cripte presenti nell'epitelio bronchiolare, cripte che rappresentano la sede elettiva di penetrazione di particelle come la silice (Galati e Damiano, 1969).

Per quanto riguarda l'origine dei minerali ritrovati nel nostro studio, c'è da dire che la loro fonte potrebbe essere molteplice: fonti naturali come l'attività vulcanica, (ricordiamo la presenza del Vesuvio), il sollevamento di polveri dal suolo, gli spray marini, le attività industriali e tutti i processi di combustione (traffico veicolare, riscaldamento domestico e inceneritori) tutte queste fonti contribuiscono alla formazione del particolato sospeso.

Per alcuni di questi minerali, come per esempio il Si è nota l'azione patogena nell'organismo umano ed animale e, il rinvenimento di quantità, a volte anche considerevoli, di polveri nei tessuti da noi esaminati in animali che sicuramente non erano stati esposti a fonti dirette del minerale, indica che deve essere prestata maggiore attenzione verso la fonte di determinate particelle e sulla loro movimentazione nell'ambiente.

L'identificazione di minerali estremamente rari in natura o sconosciuti in ambito geologico è di estremo interesse perché introduce un concetto già anticipato da Day et al. (1996), quello della biomineralizzazione. Cioè questi minerali si sono potuti formare o modificare nel corpo a seguito di alterazioni chimiche nei fluidi interstiziali.

E' importante ricordare che i motori delle autovetture producono biossido di zolfo uno dei sette più importanti inquinanti dell'aria, per cui la presenza di S potrebbe essere la diretta

conseguenza dell'inquinamento legato alle autovetture.

Infine il fosforo può entrare in circolazione o per azione erosiva atmosferica delle rocce superficiali che contengono fosforo o grazie agli spray marini (sea salt spray) e quindi possono indicare inquinamento delle acque marine (CEPA, 1998). Il significato biologico del rinvenimento di questo elemento nei tessuti animali deve essere chiarito.

Il nostro studio ci permette di concludere che gli animali domestici rappresentano un valido modello per lo studio delle patologie ambientali e che il cane in particolare rappresenta un modello "privilegiato" per il fatto che questo vivendo strettamente a contatto con l'uomo, ne condivide ambiente e stile di vita e può essere quindi considerato, secondo la diversa tipologia di studio, un plausibile modello, indicatore o sentinella in grado di offrire risultati degni di considerazione scientifica.

Bibliografia

1. Canadian Environmental Protection Act –National Ambient Air Quality Objectives for Particulate Matter. Minister, Public Works and Government services, 1998.
2. Day MJ, Pearson GR, Lucke VM, Lane SJ, Sparks RS. Lesions associated with mineral deposition in the lymph node and lung of the dog. *Vet Pathol.* Jan;33(1):29-42,1996.
3. Galati P., Damiano S.: Pneumoconiosi da polvere silicea negli ovini Rilievi istostrutturali e considerazioni patogenetiche. *La Clin. Vet.* 92, 266-289, 1969.
4. Hamada H, Vallyathan V, Cool CD, Barker E, Inoue Y, Newman LS.: Mast cell basic fibroblast growth factor in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Jun;161(6):2026-34.
5. Inoue Y, King TE Jr, Tinkle SS, Dockstader K, Newman LS.: Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders. *Am J Pathol.* 1996 Dec;149(6):2037-54.
6. Paciello O, Martano M, Restucci B, Maiolino P, Papparella S.: Indicatori biologici di inquinamento ambientale. Atti delle Giornate Scientifiche delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, Farmacia, Medicina Veterinaria e Agraria. Napoli 6/7 giugno 2002.

**UN CASO DI SOSPETTA MALFORMAZIONE VERTEBRALE COMPLESSA
(CVM) IN UN VITELLO FRISONE DI 6 MESI**

Lepri Elvio, Sforna Monica, Capuccini Silvia, Vitellozzi Giovanni

Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Perugia

Riassunto

Nel presente lavoro viene descritto il caso di un vitello di 6 mesi affetto da artrogriposi, malformazioni vertebrali (emivertebre, vertebre a cuneo) e cardiache (difetti interatriale ed interventricolare, destroposizione dell'aorta) morfologicamente riferibili a CVM. Considerando che l'età del soggetto è atipica per la condizione, si avanzano possibili interpretazioni di questa apparente incongruenza sulla base dei dati riportati in letteratura.

Parole chiave: Vitello; Malformazioni; Malformazione vertebrale complessa; CVM

Summary

Complex vertebral malformation (CVM) is an anomaly of Holstein calves recently described in Europe, USA and Japan, characterized by arthrogryposis, vertebral multiple malformations (hemivertebrae, fusion of vertebral bodies) and cardiac defects in a 50% of cases.

Affected animals are usually aborted fetuses or stillborn; in a few cases calves live few days after birth.

The cause of CVM is recognized in a defective autosomal recessive gene.

In this report we describe a case of suspect CVM in a 6 month-old female Holstein calf.

Pathological findings (monolateral arthrogryposis, multiple hemivertebrae and fused vertebral bodies, interatrial and interventricular defect with destroposition of aorta and right ventricular hypertrophy) were consistent with CVM.

If confirmed by genetic test this could be, in our knowledge, the first case of CVM in Italy. Furthermore it would represent an exception for the age of the animal affected, older than those reported in literature, and may confirm the hypothesis that CVM gene is other than a simple mendelian gene.

Long survival time in this case could be attributed to the pattern on cardiac malformations, that allowed an adequate cardio-circulatory function for a six-month life.

Key words: Calf; Malformations; Complex vertebral malformation; CVM

Introduzione

Le malformazioni rappresentano un problema nell'allevamento bovino la cui reale incidenza è probabilmente sottostimata.

Le cause possono essere estrinseche, di natura fisica, chimica o biologica, o intrinseche di tipo genetico.

Malformazioni possono colpire qualsiasi organo o apparato: nella specie bovina l'apparato muscoloscheletrico, ed in particolare la colonna vertebrale, appare frequentemente coinvolto¹. Sebbene le anomalie possano essere singole, spesso si assiste alla contemporanea presenza di malformazioni multiple in organi ed apparati diversi.

La malformazione vertebrale complessa (complex vertebral malformation: CVM) è una anomalia ereditaria che colpisce i bovini di razza frisone, segnalata per la prima volta in Olanda nel 2000^{2,3} ed in seguito in altri paesi europei come Danimarca⁴, Regno Unito⁵ e Slovenia⁶, ed extraeuropei come Stati Uniti⁷ o Giappone⁸.

I vitelli affetti mostrano ridotto sviluppo corporeo ed accorciamento del rachide, evidente soprattutto a carico del collo.

La malattia si caratterizza per la presenza, nel 93% dei casi, di malformazioni vertebrali che possono riguardare una soltanto o numerose vertebre, spesso nel tratto cervicale caudale o toracico prossimale⁴. Possono essere presenti vertebre a cuneo o emivertebre quale espressione di agenesia monolaterale parziale o completa degli emisclerotomi, o vertebre a blocco, dovute alla mancata divisione dei somiti. Spesso tali

malformazioni provocano deviazioni dorsoventrali (lordosi, cifosi) o laterali (scoliosi) della colonna³. Possono coesistere malformazioni costali rappresentate da coste assenti o non articolate alle vertebre, capitelli doppi o fusi⁴.

L'artrogriposi è presente nel 91% dei soggetti⁴, spesso bilaterale simmetrica a carico sia degli anteriori che dei posteriori, con estensione dell'articolazione tarsica e flessione di carpo e nodelli, accompagnata da rotazione mediale delle falangi³.

Le malformazioni cardiache si osservano nel 50-63% dei soggetti⁴ e sono rappresentate da ipertrofia eccentrica ventricolare destra, difetti interventricolari e destroposizione parziale o completa dell'aorta³.

Le malformazioni vertebrali possono presentarsi non associate a malformazioni cardiache, ma la possibilità che si verifichi la condizione opposta non è conosciuta, così come la possibile presenza di altre malformazioni intercorrenti.

Nel 75% dei casi i soggetti affetti muoiono precocemente (prima del 280° gg di gestazione) e sono riassorbiti. Nel restante 25% dei casi i vitelli sono abortiti, nascono morti o muoiono nell'immediato post partum¹⁰. Raramente i vitelli sopravvivono alcuni giorni.

La malattia sembra essere dovuta alla mutazione di un gene, recentemente individuato a livello del cromosoma bovino numero 3, responsabile della sintesi di una proteina con funzione di transporter per uno zucchero nucleotide-associato⁹.

Sulla base dell'esame dei pedigree degli animali affetti e del modello di trasmissione, i ricercatori danesi scopritori della CVM la inquadrarono come malattia genetica a trasmissione semplice di tipo autosomico recessivo³.

La mutazione responsabile della CVM sembra essere insorta nel toro Penstate Ivanhoe Star e da questi trasmessa alla progenie, ed in particolare ad uno dei suoi figli, Carlin-M Ivanhoe Bell, toro ampiamente utilizzato per la FA in tutto il mondo (si calcola che il 10% della popolazione di frisoni negli USA sia discendente di questo toro) e reale diffusore mondiale della mutazione. Tuttavia non è impossibile che soggetti non discendenti da Bell ma da altri figli di Star possano essere ugualmente portatori della mutazione³.

La diagnosi di CVM è anatomopatologica, sebbene una conferma definitiva possa venire

soltanto dall'esame del DNA per la ricerca del gene mutato.

La diagnosi anatomopatologica è basata sulla presenza contemporanea di artrogriposi e delle tipiche malformazioni vertebrali, associate a ridotto sviluppo corporeo e, quando presenti, a malformazioni cardiache. Tuttavia l'artrogriposi è comunemente associata a malformazioni vertebrali, ed anche le malformazioni cardiache sono relativamente comuni nel bovino, per cui una diagnosi differenziale tra CVM e malformazioni ad eziopatogenesi diversa è in alcuni casi impossibile². La diagnosi definitiva scaturisce dall'esame genetico del soggetto o dei genitori per l'evidenziazione del gene mutato. Nella comunità scientifica internazionale non c'è tuttavia accordo sulla reale attendibilità dei test genetici disponibili, anche perché recentissima è l'identificazione del gene presunto responsabile della CVM.

Materiali e metodi

Le nostre osservazioni si riferiscono ad un vitello femmina di razza frisona di 6 mesi di età, sottoposta a visita clinica in quanto affetta da sindrome respiratoria.

Il soggetto proveniva da un piccolo allevamento in cui si ricorreva alla fecondazione artificiale con seme congelato, ed in cui erano riportati in passato episodi di malformazioni scheletriche non meglio precisate e mai sottoposte ad indagine.

Alla visita clinica il soggetto mostrava ridotto accrescimento corporeo, con reperti clinici e strumentali compatibili con cardiopatia congenita.

Risultati

All'esame esterno è stata evidenziata una flessione del nodello posteriore sinistro con leggera deviazione mediale delle falangi.

Il cuore si presentava di forma globosa per una modesta ipertrofia del ventricolo destro. All'apertura degli atri si evidenziava un ampio difetto interatriale alto di tipo *ostium secundum* con membrana cribrosa parzialmente occludente. Nei ventricoli era presente un ampio difetto alto della porzione membranosa del setto interventricolare, di forma ovale e dimensioni 4,5 x 3 cm, che si apriva al di sotto del lembo settale delle valvole. Era presente una trasposizione completa dell'aorta, con cono di efflusso spostato

completamente nel ventricolo destro, appena a lato del difetto interventricolare, e dislocazione laterale del tronco dell'arteria polmonare, che presentava una modesta dilatazione sopravvalvolare.

Le anomalie vertebrali erano confinate al tratto T5-T10 e caratterizzate dalla presenza di un'emivertebra (T7) e di due vertebre a cuneo (T6 e T8) che conferivano al tratto una doppia curvatura scoliotica. I dischi intervertebrali tra le vertebre malformate apparivano normali.

Erano inoltre presenti coste "spurie" non articolate alla colonna e coste con capitelli doppi.

Sulla base dei reperti anatomopatologici è stato emesso un sospetto di CVM; è stato quindi richiesto un supplemento anamnestico e, sebbene l'esame del pedigree dell'animale sia risultato difficoltoso, la bovina in esame è risultata figlia di Tucker, discendente di Bell, il toro diffusore della CVM.

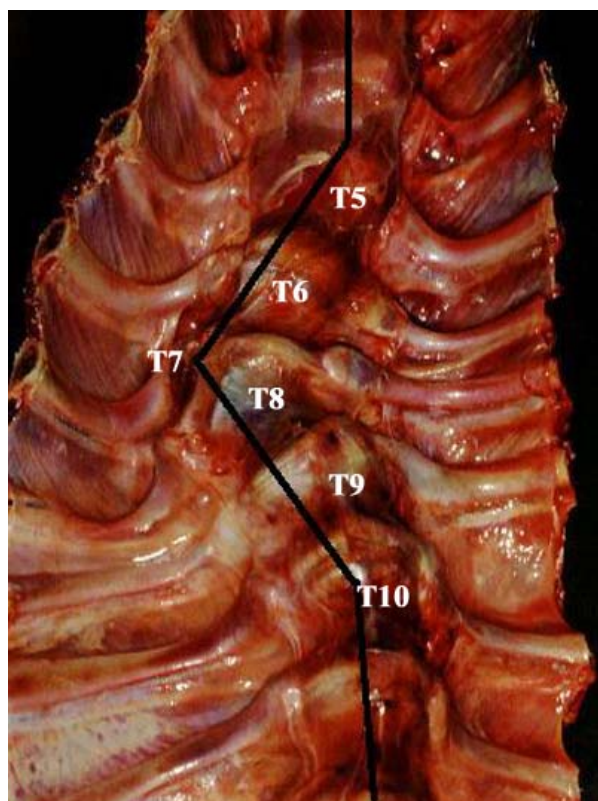


Figura 1. Bovino, tratto vertebrale toracico: evidente scoliosi tra T5 e T10, dovuta alla presenza di emivertebra (T7) e vertebre a cuneo (T6 e T8).

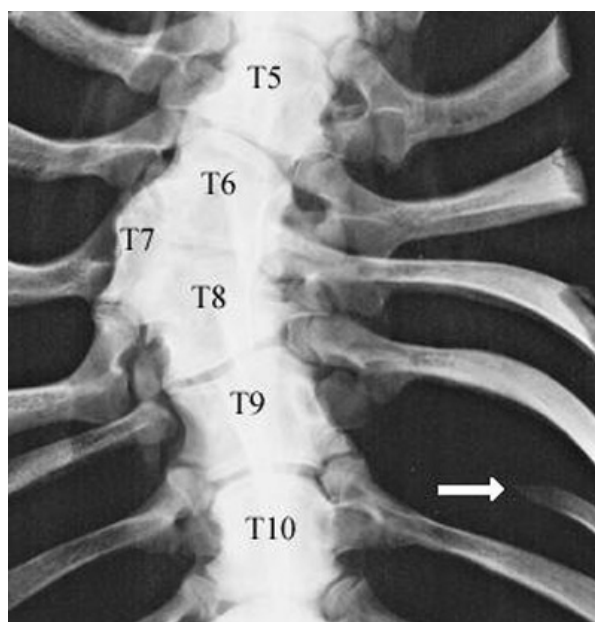


Figura 2. Bovino, radiografia del tratto vertebrale toracico T5-T10: si evidenzia un'emivertebra (T7) e due vertebre a cuneo (T6 e T8); i dischi intervertebrali appaiono normali; evidente anche una costola "spuria" non articolata con la colonna (freccia).

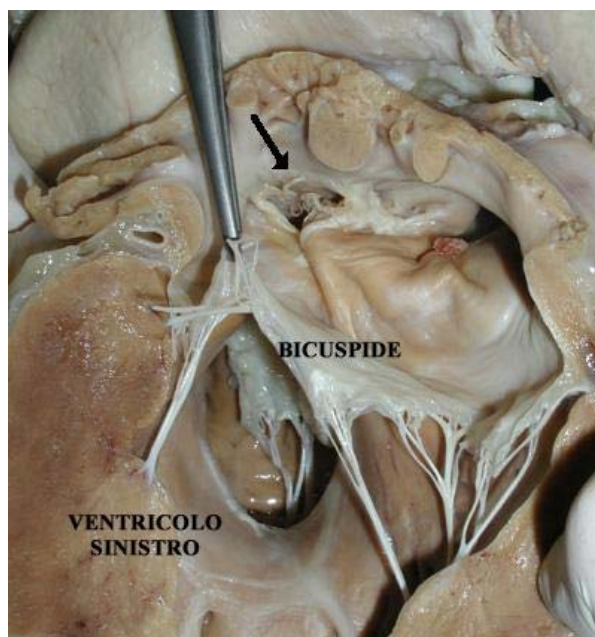


Figura 3. Bovino, cuore fissato in formalina, visione dal ventricolo sinistro: evidente un ampio difetto interventricolare e un difetto interatriale (freccia).

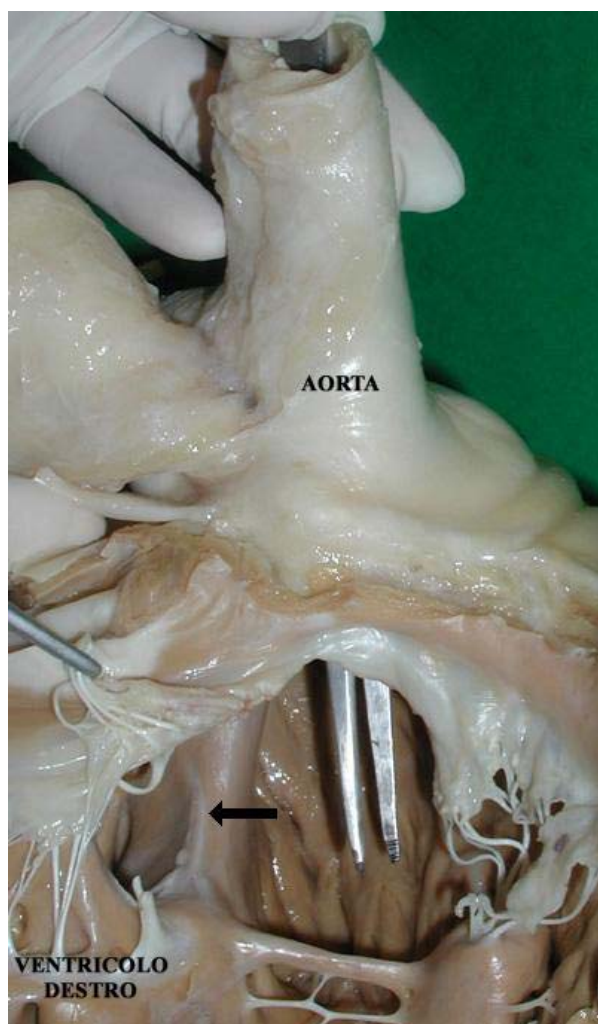


Figura 4. Bovino, cuore fissato in formalina, visione dal ventricolo destro: destroposizione completa dell'aorta che origina dal ventricolo destro a lato del difetto interventricolare (freccia).

Discussione

Nessuna delle malformazioni osservate è, di per sé, patognomica di CVM. Sebbene le malformazioni vertebrali e cardiache risultino tra le più frequentemente osservate nel bovino, la loro contemporaneità e l'evidente analogia morfologica con quelle descritte in letteratura ci ha spinto ad avanzare una diagnosi presuntiva di CVM. Anche l'artrogriposi, reperto relativamente comune e dalla patogenesi assai varia, assume particolare significato se considerata nel contesto delle altre malformazioni osservate.

La particolarità di questo caso risiederebbe nell'età dell'animale affetto. In letteratura infatti viene riportato che gli animali affetti che giungono a fine gravidanza costituiscono una

percentuale ridotta, e comunque muoiono o vengono sacrificati nei primi giorni di vita.

La sopravvivenza prolungata dell'animale in esame potrebbe essere dovuta alla modesta gravità delle malformazioni osservate, in particolare quelle vertebrali, limitate a poche vertebre; inoltre la tipologia di malformazione cardiaca, con la presenza di ampie comunicazioni tra il cuore destro e sinistro, potrebbe aver consentito una funzionalità cardiaca adeguata al raggiungimento dell'età di 6 mesi.

E' opinione di alcuni Autori che l'insieme delle malformazioni che caratterizza la CVM si possa esprimere con gravità diverse e variabili, non necessariamente letali, e che diverse combinazioni di anomalie possano essere comprese in questa condizione¹², con possibili fenomeni di espressività incompleta.

La genetica della CVM presenta tuttora degli aspetti non completamente definiti. Gli Autori danesi che nel 2000 descrissero la CVM la inquadrarono come malattia a trasmissione mendeliana semplice autosomica recessiva. Tuttavia successivi e più estesi studi di segregazione sulla popolazione di bovini danesi hanno ottenuto risultati solo in parte in linea con quelli attesi da un carattere ad ereditarietà semplice; anche la frequenza di casi di CVM tra i bovini holstein statunitensi, il 10% dei quali discende da Bell, è inferiore rispetto a quella prevedibile. Queste considerazioni hanno spinto alcuni studiosi ad ipotizzare che l'ereditarietà del carattere CVM potrebbe essere complessa piuttosto che semplice recessiva¹¹.

Conclusioni

Se confermato dal risultato dell'esame genetico il caso discusso sarebbe, a nostra conoscenza, la prima segnalazione di CVM in Italia, fatto non sorprendente data la dimostrata diffusione mondiale della condizione. Inoltre esso rappresenterebbe un'eccezione per l'età del soggetto rispetto ai casi segnalati in letteratura.

Si prospetterebbe quindi la possibilità, da confermare mediante un dettagliato e sistematico studio di molti più casi, che la CVM possa essere un carattere ad ereditarietà complessa, la cui espressione fenotipica potrebbe essere influenzata anche da fattori endogeni ed esogeni ancora non noti.

Bibliografia

1. Leipold HW, Hiraga T e Dennis S. Congenital defects of the bovine musculoskeletal system and joints. *Vet Clin of North Am Food Animal Practice*. 1993; 9; 93-104
2. Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O e Arnbjerg J. Complex vertebral malformation in Holstein calves. 2000. www.lr.dk/kvaeg/informationsserier/nyheder/CVM.pdf
3. Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O e Arnbjerg J. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest*. 2001; 13; 283-289
4. Wouda W, Borst GHA, Vos JH, Peperkamp NHMT, Visser IJR e Zeeuwen AAPA. A newly recognized hereditary syndrome in Holstein-friesian calves characterized by vertebral malformations, cervico-truncal dwarfism, arthrogryposis and cardiac defects. *Atti del 19° meeting ESVP, Thessaloniki, 25-28 Settembre 2001*: 168
5. Revell S. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Vet Rec*. 2001; 149(21): 659-60
6. Snoj T. Kompleksna vertebralna malformacija pri teletih črno-bele pasme (Complex vertebral malformation in holstein calves) *Veterinarske Novice St*. 2002; 5; 199
7. Duncan RB Jr, Carrig CB, Agerholm JS e Bendixen C. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA. *J Vet Diagn Invest*. 2001; 13 (4); 333-6
8. Nagahata H, Oota H, Nitana A, Oikawa S, Higuchi H, Nakade T, Kurosawa T, Morita M, Ogawa H. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *J Vet Med Sci*. 2002; 64: 1107-12
9. Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Hoj A, Holm LE, Nielsen VH, Bendixen C. Identification of the gene causing complex vertebral malformation (CVM) in cattle (*Bos taurus*). *Atti del Plant & Animal Genomes XII conference, San Diego CA, 10-14 Gennaio 2004*
10. www.absglobal.com/tech_services/techline_article/s/cvm.pdf
11. Steffen DJ. CVM threatens holstein herds: veterinarians are urged to report, submit abnormal holstein calves to research centers. 2001 www.selectsires.com/cvm_reprint.html
12. Johnson VS, Ellis K, Martineau H, Thompson H e Barret DC. Bovine spinal anomaly with anatomical similarities to complex vertebral malformation. *Vet Rec* 2003; 153; 598-600

OSSERVAZIONI ISTOCHIMICHE E IMMUNOISTOCHIMICHE SULL'IPOFISI ANTERIORE DI UN CANE AFFETTO DA MALATTIA DI CUSHING

*Stefano Rocca, Salvatore Pirino, Elisabetta Antuofermo, Stefania Idili, Gabriella Casula,
Antonica Mura, Antonio Leoni

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria – *Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Facoltà di Medicina – Università degli Studi di Sassari

Riassunto

Gli adenomi del lobo anteriore dell'ipofisi sono neoplasie benigne piuttosto frequenti. Essi mostrano aspetto circoscritto e accrescimento non invasivo nei confronti dei tessuti circostanti. Il tumore a cellule secernenti ACTH, che colpisce le cellule cromofobe della pars anteriore dell'ipofisi, è uno di questi e viene associato alla sindrome di Cushing, causando evidente ipercortisolemia per stimolazione della corteccia surrenale. Un cane meticcio, femmina, di 7 anni, in terapia per sospetta Sindrome di Cushing e pervenuto a morte, è stato sottoposto ad accurato esame necroscopico, durante il quale si procedeva tra l'altro a prelevare ghiandole surrenali, polmone, fegato, cute, muscoli e intera ghiandola pituitaria. Su detti organi veniva eseguito l'esame istopatologico per la ricerca delle lesioni tipiche determinate dalla sindrome. Sulla ghiandola pituitaria, aumentata notevolmente di volume, venivano eseguite indagini istopatologiche specifiche, mediante colorazione OFG, per differenziare gli istotipi costituenti la pars anteriore. Tale colorazione ha consentito di riscontrare e identificare tra le cellule pituitarie gli elementi acidofili, basofili e cromofobi; queste ultime cellule, aumentate di numero, erano d'aspetto omogeneo e formavano un nucleo compatto e con scarso stroma al centro della ghiandola. La caratterizzazione cromatica e la differenziazione dai restanti istotipi ha reso possibile identificare la neoplasia come adenoma ipofisario di tipo "diffuso", caratterizzato per l'appunto da cellule disposte a strati, con scarso stroma e debole vascolarizzazione. Per verificare l'ormonoattività delle cellule neoplastiche si è proceduto all'esame immunoistochimico per la ricerca dell'ACTH. Il risultato di tale indagine ha dato esito positivo, confermando l'intensa attività secernente delle cellule oggetto di studio.

Parole chiave: Ipofisi Anteriore, Surrenali, Cellule Cromofobe, ACTH

Summary

Histochemical and immunohistochemical observations in anterior pituitary gland of a dog affected by cushing disease. Functional tumors in the pituitary gland are benign neoplasms most commonly in the dog. They are derived from corticotroph cells (ACTH-secreting) in pars distalis and intermedia and associated with a clinical syndrome of cortisol excess (Cushing's like disease). We report the histologic, histochemical and immunohistochemical features of a pituitary gland in Cushing disease in one bitch of 7 years old. The neoplasm appeared well differentiated with numerous chromophobe cells with aspect of diffuse adenoma type. The anti-ACTH antibody are used to verified the ormono activity of neoplasm.

Key Word: Anterior Pituitary gland, Adrenal gland, Chromophobe cells, ACTH

Introduzione

I tumori a carico dell'ipofisi in genere si caratterizzano per dei quadri disendocrini piuttosto gravi.

Tali quadri sono dovuti o a fenomeni di compressione e alterazione dei parenchimi adiacenti la neoplasia (ipotalamo e altre parti della stessa ghiandola) o per una conservata capacità secretoria nelle cellule che costituiscono lo stesso tumore, il quale sfugge ai normali meccanismi di feedback dell'organismo. Inoltre si ricorda che i tumori a carico della porzione anteriore dell'ipofisi, sono prevalentemente adenomi e possono essere formati in genere: da cellule cromofobe (adenoma funzionale a cellule cromofobe ACTH secernente, frequente nel cane),

da cellule acidofile (adenoma funzionale a cellule acidofile GH o PRL secernente, frequente nell'uomo e raro nei nostri animali), mentre sono di raro riscontro neoplasie come l'adenoma delle cellule basofile e il carcinoma delle cellule cromofobe. Com'è noto, gli ormoni che sono liberati da questa ghiandola sono prodotti da sottopopolazioni cellulari differenti. Essenzialmente nella ghiandola pituitaria anteriore si ritrovano principalmente tre istotipi, classificabili in base alle loro affinità tintoriali: cellule cromofile acidofile (GH+, PRL+); cellule cromofile basofile (TSH+, ACTH+, LH+, FSH+) e cellule cromofobe (ritenute forme quiescenti e degranulate delle cellule cromofile). La caratterizzazione di tali istotipi dal punto di vista morfo-istochimico nell'ambito neoplastico trova ancora una vasta applicazione, ma si è rivelato un sistema del tutto superato ed inadeguato, poiché non si riesce a stabilire con certezza un orientamento preciso sulle cellule coinvolte e la loro attività ormono-secernente. A tale riguardo, le metodiche di immunoistochimica permettono di avere degli ulteriori contributi che possono rendere più chiari dei quadri altrimenti di difficile classificazione, in relazione soprattutto all'attività che le cellule neoplastiche possono avere nell'ambito di patologia complesse come l'iperadrenocortisolemia.

Materiali e metodi

Oggetto del nostro studio è stato un cane meticcio femmina ovario-isterectomizzata di sette anni, in cura presso una struttura veterinaria privata per sospetta malattia di Cushing. L'animale è stato sottoposto ad eutanasia dopo circa un anno di terapia a seguito di una grave crisi dispnoica. Sul cadavere sono stati eseguiti i seguenti accertamenti:

Esame anatomo-istopatologico per confermare le lesioni tipiche da ipercortisolemia;

Esame istopatologico specifico dell'ipofisi per differenziare gli istotipi che caratterizzano la porzione anteriore della ghiandola pituitaria e l'origine delle cellule neoplastiche;

Confermare l'ormonoattività della neoplasia mediante tecnica immunoistochimica per l'ormone adrenocorticotropo.

Esame anatomopatologico: È stato eseguito l'esame esterno del cadavere, della cute e delle

masse muscolari, inoltre sono stati controllati gli organi interni con particolare attenzione alle ghiandole surrenali e alla ghiandola pituitaria che è stata asportata in toto.

Esame istopatologico: i campioni sono stati fissati in formalina tamponata la 10%, inclusi in paraffina e sezionati ad uno spessore di 3 µm. le sezioni sono state colorate con ematossilina e eosina, PAS e con il metodo OFG (*Slidders 1961*). In particolare quest'ultima colorazione permette di differenziare in giallo le cellule acidofile, in rosso-magenta le cellule basofile e in blu-grigio le cellule cromofobe). Tale metodica prevede i seguenti passaggi:

colorazione dei nuclei mediante ematossilina

differenziazione in alcool-acido

colorazione con orange G

colorazione con fucsina acida

un trattamento con acido fosfotungstico

colorazione con verde luce

Esame immunoistochimico: Le sezioni per immunoistochimica, sezionate ad uno spessore di 3 µm, sono state montate su vetrini pretrattati con 3-aminopropyl-triethoxylane. Dopo lo sparaffinamento si è proceduto allo smascheramento degli antigeni con due trattamenti medianate forno a microonde a 750W per 4' ciascuno in tampone citrato pH 6.0, evitando l'over-riscaldamento del tampone stesso. Le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo monoclonale anti-ACTH a una diluizione di 1:75 (Dako, clone 02A3) o/n. Per la reazione di rivelazione si è usato il kit Immunoperoxidase LAB/Probe Kit Streptavidina-biotina che utilizza come cromogeno la diaminobenzidina.

Risultati

Esame anatomopatologico: All'esame macroscopico del cadavere, sono state riscontrate lesioni tipiche riconducibile ad una ipercortisolemia con aree alopeciche simmetriche. Esteriormente si osservava assottigliamento della cute e calcificazioni cutanee. A carico degli organi interni si segnalavano inoltre calcificazioni a carico del polmone il quale non collassava dopo l'apertura del torace ed appariva congesto e aumentato di peso e di volume, mentre sul cuore si osservava una grave endocardiosi valvolare a livello della valvola atrioventricolare di destra. Le ghiandole surrenali si presentavano ipertrofiche

con una superficie ricca di nodulini, mentre l'ipofisi appariva anch'essa aumentata di volume e di forma irregolare a livello della sua porzione anteriore.



Figura 1. Ipertrofia di tipo nodulare bilaterale a carico delle surrenali confermata istologicamente.

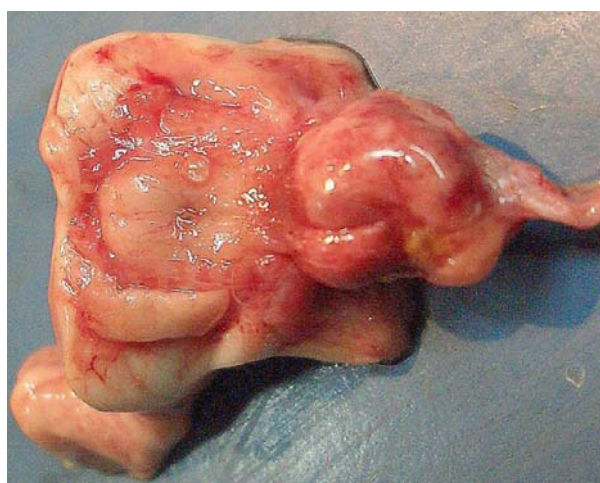


Figura 2. L'ipofisi appariva aumentata di volume e di forma irregolare a livello della sua porzione anteriore.

Esame istopatologico: per quanto riguarda l'esame istopatologico abbiamo preso in considerazione lo stato delle surrenali le quali apparivano alterate strutturalmente ma senza segni riconducibili ad una trasformazione neoplastica, la corticale appariva ipertrofica con particolare sviluppo della zona fasciolata e reticolare. La componente stromale era presente in fasci, tali strutture si portavano dalla superficie all'interno

della ghiandola dandole nel complesso un aspetto nodulare. Nell'ambito dell'ipofisi anteriore si poteva osservare un'area a cellularità omogenea che andava a costituire un nodulo ben delimitato all'interno del parenchima sano, rivelando la tendenza espansiva ma non infiltrativa della neoplasia. Tale limite era distinguibile a maggiore ingrandimento; l'aspetto classico del parenchima ghiandolare riunito in cordoni epiteliali, contrastava rispetto alla porzione competente la neoplasia, dove apparivano cellule nel complesso d'aspetto compatto, di varia grandezza, di forma poliedrica, con nuclei modicamente aumentati di volume e alcune figure mitotiche. Nel complesso la neoplasia appariva con la caratteristica architettura del tipo "adenoma diffuso a cellule cromofobe", infatti le cellule erano organizzate a fogli sovrapposti, la vascolarizzazione era presente e lo stroma connettivale, sottile, accompagnava i cordoni cellulari. La caratterizzazione istochimica della neoplasia mediante la colorazione OGF rendeva evidente le cellule cromofobe che apparivano chiaramente in azzurro, mentre ai margini della neoformazione si potevano notare la prevalenza, in giallo, delle cellule acidofile.

Esame immunoistochimico: la rilevazione con la tecnica immunoistochimica permetteva di confermare l'ormonoattività della neoplasia nei confronti dell'ACTH. Il segnale appariva compatto e forte a livello dell'adenoma, mentre nel parenchima circostante non coinvolto, il segnale appariva scarso ed incostante.

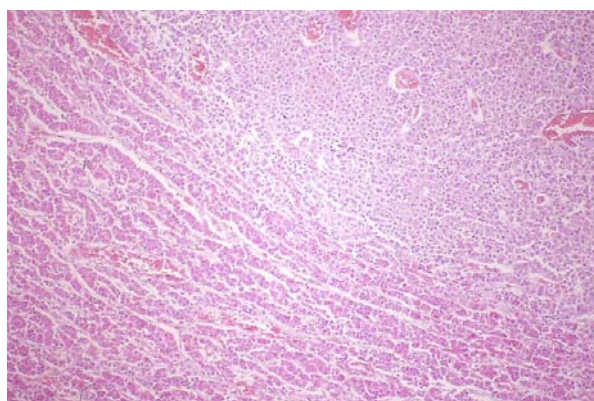


Figura 3. Nell'ambito dell'ipofisi anteriore si poteva osservare un'area a cellularità omogenea che andava a costituire un nodulo ben delimitato all'interno del parenchima normale. E.E. 10X

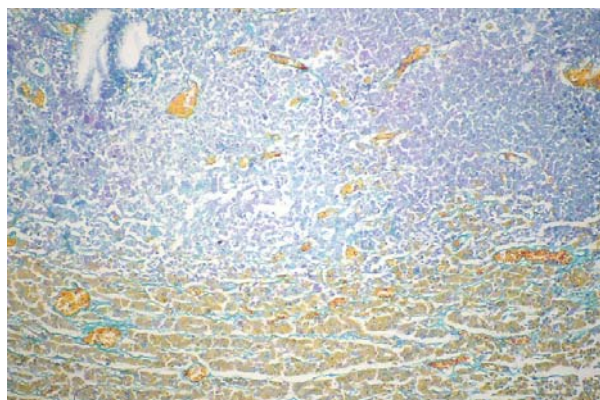


Figura 4. Caratterizzazione istochimica delle cellule cromofobe che appaiono chiaramente rappresentate in azzurro nell'ambito della neoplasia, mentre ai margini della stessa si può notare la prevalenza, in giallo, delle cellule acidofile. OFG 10X

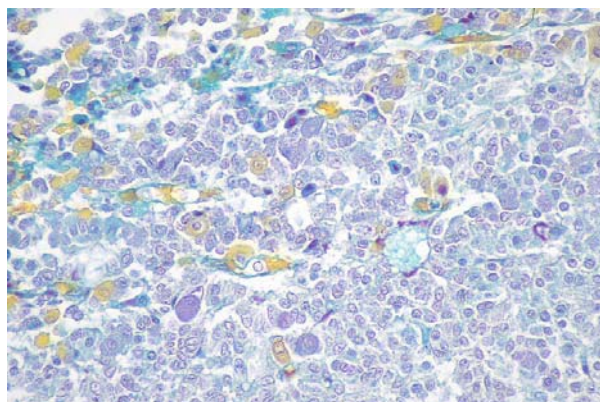


Figura 5. Le cellule cromofobe appaiono di dimensioni variabili con la caratteristica architettura del tipo "diffuso". OFG 40X

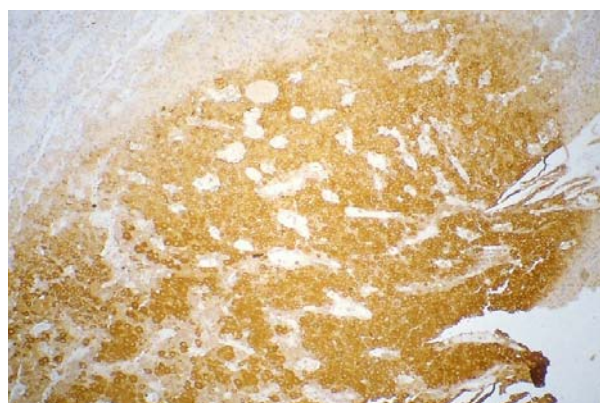


Figura 6. Evidente positività in corrispondenza della neoplasia che conferma l'ormoattività dell'adenoma. IHC 4X

Discussione e conclusioni

Lo studio delle neoplasie a carico della porzione anteriore dell'ipofisi, non prescinde dalla

caratterizzazione istochimica ed immunoistochimica della popolazione cellulare che compone la neoplasia stessa. Questo perché ogni sottopopolazione cellulare ha un suo preciso compito nell'ambito della normale funzione fisiologica della ghiandola, inoltre alcuni ormoni (ACTH in particolare) possono essere prodotti sia dagli elementi cellulari "differenziati" basofili in condizioni fisiologiche, sia in condizioni patologiche, dai precursori di questi ultimi ovvero gli elementi cromofobi. In linea con i dati riportati in bibliografia, questo tipo di adenomi hanno una tendenza espansiva lenta, che però a lungo andare determinano oltre allo squilibrio ormonale imputabile ad un'ipersecrezione di ACTH, un'ipofunzionalità da compressione delle strutture limitrofe alla ghiandola stessa (ipotalamo in particolare). Non vanno escluse inoltre, anche se rare, eventuali forme neoplastiche miste che possono complicare il quadro classificativo del tumore. In questo contesto l'abbinamento della tecnica istochimica OFG ed immunoistochimica per la ricerca dell'ormone ACTH, ha permesso di confermare le ipotesi diagnostiche cliniche e istopatologiche, ovvero di una neoplasia funzionale capace di stimolare in maniera continua la corticale della surrenale determinando una sindrome ipercortisolemica sistemica.

BIBLIOGRAFIA

1. El Etreby MF, Muller-Peddinghaus R, Bhargava AS, Trautwein G. Functional morphology of spontaneous hyperplastic and neoplastic lesions in the canine pituitary gland. *Vet Pathol.* 1980 Mar;17(2):109-22.
2. Trouillas, J., Guigard, M. P., Fonlupt, P., Souchier, C. And Girod, C. Mapping of corticotropic cells in the normal human pituitary 1996 *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44, 473-479.
3. N. J. Schoemaker, M. H. van der Hage, G. Flik, J. T. Lumeij and A. Rijnberk Morphology of the Pituitary Gland in Ferrets (*Mustela putorius furo*) with Hyperadrenocorticism *J. Comp. Path.* 2004, Vol. 130, 255-265
4. Donald J. Meuten *Tumors in Domestic Animals* IV° Edition
5. Paolo Stefano Marcato *Patologia Sistematica Veterinaria Sistema endocrino* (2002)
6. Davids J. Dabbs *Diagnostic Immunohistochemistry*
7. John D: Bancroft, M. Gamble *Theory and Practice of Histological Techniques* V° Edition

L'UROPLACHINA IIIB: NUOVO MARKER PER I TUMORI VESCICALI NEI BOVINI ASSOCIATO ALL'INFEZIONE DA PAPILLOMAVIRUS BOVINO TIPO-2.

Russo Valeria, Ambrosio Vincenzo, Borzacchiello Giuseppe, Galati Pasquale, Roperto Sante*, Roperto Franco

Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Sezione di Patologia generale ed Anatomia patologica;
*Sezione di Malattie Infettive – Facoltà di Medicina veterinaria - Università degli Studi di Napoli
“FEDERICO II”

Riassunto

I tumori della vescica negli animali domestici sono rari. Tuttavia bovini che pascolano su terreni ricchi in felce (*Pteridium spp*) spesso sviluppano neoplasie vescicali dalle quali si può isolare il DNA del papillomavirus bovino tipo 2.

Le uroplachine, proteine specifiche della differenziazione uroteliale dei mammiferi, costituiscono l'Asimmetric Unit Membrane (AUM). In condizioni normali esse sono espresse dalle cellule uroteliali dello strato più superficiale.

L'UPIIB viene considerata un marker specifico per i tumori uroteliali dell'uomo e del cane.

Scopo del presente lavoro è lo studio dell'espressione dell'uroplachina IIIB nei tumori vescicali dei bovini.

Sono stati utilizzati 50 tumori vescicali bovini. Per le indagini di immunostochimica ed immunofluorescenza è stato utilizzato un anticorpo primario gentilmente fornito dal Prof. T-T-Sun (New York - Medical School).

Nell'urotelio normale l'immunoreattività per l'UPIIB è evidente sulle membrane delle cellule luminali e nel citoplasma di cellule degli strati intermedi. Nei papillomi l'espressione dell'UPIIB si manifesta a livello della membrana (pattern superficiale) e a livello intercellulare.

Il pattern superficiale è frequente anche nei carcinomi papillari endoluminali ed infiltranti. Sono altresì presenti cellule delineate da una immunoreattività di membrana (pattern periferico) e/o citoplasmatica sia diffusa che “a macchia”.

I patterns luminale e periferico sono presenti anche nei carcinomi non-papillari infiltranti.

Il presente studio dimostra che l'uroplachina IIIB può essere considerata un nuovo marker per i tumori vescicali del bovino sebbene la sua espressione non sembra essere correlata con il comportamento biologico di tali tumori essendo evidente indipendentemente dal grado e stadio.

Parole chiave: Papillomavirus bovino; uroplachina IIIB; Tumori uroteliali.

Summary

Uroplakin IIIB: a novel marker for bovine urinary bladder tumours associated to bovine papillomavirus type 2 infection. Urinary bladder tumours are commonly encountered in cows that have been grazed on pastures rich in bracken fern (*Pteridium spp.*), which seems to act in synergism with bovine papillomavirus type 2 (BPV-2).

Uroplakins are specific mammalian urothelial related proteins. They form the so called Asimmetric Unit Membrane (AUM), being normally expressed only by the so called umbrella cells.

The aim of the present study is to investigate UPIIB expression in bovine urinary bladder tumours.

UPIIB was detected in fifty neoplastic samples. For immunohistochemical and immunofluorescence analysis a primary antibody kindly provided by Prof. T-T-Sun from New York - Medical School was applied.

In control animals UPIIB expression was evident as a continuous line covering luminal cells; some intermediate cells showed intracytoplasmic UPIIB immunoreactivity. In papillomas, UPIIB expression was evident as a superficial staining (superficial pattern). Superficial pattern was also evident in papillary non infiltrating and infiltrating carcinomas. Peripheral pattern was seen as a linear staining of cell membrane. Some urothelial neoplastic cells showed both diffuse or patchy intracytoplasmic immunoreactivity too. Luminal and peripheral patterns characterized non-papillary infiltrating carcinomas.

This study shows that UPIIB can be considered as a novel marker for bovine urothelial tumours,

although it is not of value for assessing the biological behaviour of urothelial tumours in cows as it is detectable in the all urothelial tumours regardless of their stage and grade.

Key words: Bovine papillomavirus; Uroplakin IIIB; Urothelial tumours.

Introduzione

I tumori della vescica negli animali domestici hanno un'incidenza molto bassa. Tuttavia, bovini che pascolano su terreni ricchi in felce (*Pteridium* ssp) sviluppano una sindrome clinica nota come ematuria enzootica cronica (EEC) che spesso si complica con tumori della vescica.

Un ruolo importante nella patogenesi di questi tumori sembra venga svolto dall'azione sinergica tra sostanze tossiche contenute nella felce e il papillomavirus bovino tipo 2 (BPV-2).

L' intimo meccanismo patogenetico con cui l'eventuale azione sinergica tra il BPV-2 e le sostanze flogogene (braxina A,B e C), clastogene (quercetina) ed oncogene (ptaquiloside) contenute nella felce si rende responsabile di patologie vescicali che si complicano con tumori, uroteliali e non, rimane a tutt'oggi sconosciuto.

In un recentissimo studio da noi condotto, è stato rinvenuto non solo il DNA del BPV-2 nei tumori vescicali associati all'EEC, ma anche l'espressione dell' oncoproteina E5 a conferma del ruolo svolto dal papillomavirus nel determinismo delle neoplasie vescicali (Borzacchiello et al., 2003).

L'urotelio dei mammiferi è composto da cellule superficiali, intermedie e basali.

Sulla membrana plasmatica delle cellule uroteliali più superficiali sono presenti dei prodotti di differenziazione dell'urotelio normale, le c.d. placche uroteliali (AUM).

I costituenti molecolari principali dell'AUM sono le uroplachine (UPs).

In condizioni normali, le uroplachine sono espresse dalle cellule uroteliali dello strato più superficiale (Wu et al., 1990 e 1993).

Finora erano note quattro molecole transmembranarie a diverso peso molecolare: UPIa, UPIb, UPII, UPIII.

Recentemente è stata descritta una nuova uroplachina con un peso molecolare pari a 35 kDa (p35), la cui sequenza aminoacidica è omologa

all'UPIII, di cui si conoscono due isoforme: UPIIIa (UPIII) e UPIIIb (p35) (Deng et al.,2002). Recentemente è stato dimostrato che l'espressione delle uroplachine può essere alterata nei tumori uroteliali del cane e dell' uomo (Kaufmann et al.,2000).

A tale proposito abbiamo già dimostrato in un precedente lavoro che l'espressione delle UPs può essere alterata anche nei tumori vescicali del bovino associati all'EEC (Ambrosio et al., 2001). Scopo del presente lavoro è lo studio dell'espressione dell'UPIIIb nei tumori uroteliali dei bovini.

Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 50 campioni di tumori vescicali di bovini clinicamente affetti da ematuria enzootica cronica. In particolare per questo tipo studio sono stati utilizzati solo i campioni positivi per la presenza del DNA del BPV-2.

I campioni sono stati fissati in formalina al 10% ed inclusi in paraffina.

Dai campioni sono state allestite sezioni di 4µm che sono state poi colorate con le più comuni colorazioni istologiche (E.E.).

La diagnosi istologica è stata eseguita secondo i criteri della più recente classificazione istologica dei tumori della vescica del WHO.

Per l'analisi virale e la successiva selezione dei casi, i campioni sono stati congelati a -80°C e sottoposti a PCR utilizzando primers specifici per il BPV-2.

Per l'indagine immunistochemica è stato utilizzato il metodo streptavidina-biotina-perossidasi. L'anticorpo primario, ottenuto nel coniglio da estratti di UPIIIb bovina, (gentilmente fornito dal Dr. Tung-Tien Sun della New York University School of Medicine), è stato diluito 1:200 in PBS ed applicato overnight a 4°C.

Le sezioni sono state quindi incubate con un anticorpo secondario 1:200.

Per l' indagine di immunofluorescenza è stato applicato lo stesso anticorpo primario ad una diluizione di 1:20; le sezioni sono state poi incubate con un anticorpo secondario coniugato con FITC ed il nucleo è stato contrastato con Ioduro di propidio (Sigma, Italia) alla diluizione di 1/50.

Risultati

Nell' urotelio di controllo l'espressione dell'UPIIB appare come una linea continua sulle membrane delle cellule luminali e nel citoplasma delle cellule dello strato intermedio.

In tutti i papillomi esaminati, l'espressione dell'UPIIB è evidente una reazione lineare superficiale di membrana (pattern superficiale). E' altresì evidente una positività intercellulare.

Il pattern superficiale è evidente anche nei carcinomi papillari endoluminali e papillari infiltranti. In particolare si riscontra anche un tipico pattern lunale e microlunale. Tali patterns sono caratterizzati dalla positività della porzione superficiale di membrana tale da formare lumi e microlumi.

E' altresì evidente un pattern periferico. Esso è caratterizzato da una positività focale di membrana. In molti casi le cellule mostrano un' immunoreattività di membrana che disegna il perimetro delle singole cellule.

Il pattern periferico è stato rilevato anche in due casi di metastasi linfonodali lombo-aortiche.

Nei carcinomi non papillari, una forte immunoreattività intracitoplasmatica è presente in alcune cellule intermedie e basali dell' urotelio adiacenti alla proliferazione neoplastica.

Discussione

In questo studio è stato dimostrato che l'espressione delle UPIIB è alterata in corso di cancerogenesi vescicale del bovino.

I pattern d'espressione da noi evidenziati sono stati: superficiale, lunale (incluso il microlunale) e periferico.

In particolare l'immunoreattività discontinua ed irregolare di membrana (pattern superficiale) riscontrata nelle cellule uroteliali neoplastiche più superficiali riflette le alterazioni dei processi di differenziazione.

Sebbene non siano riportati studi ultrastrutturali, è ragionevole pensare che, come già dimostrato nella cancerogenesi vescicale sperimentale (Ogawa et al.,1996) e nei tumori spontanei uroteliali dell' uomo (Kaufmann et al.,2000), anche nei casi da noi studiati, le Ups sono presenti sulle membrane cellulari ma non correttamente assemblate a formare l' AUM. Ciò testimonia che la differenziazione terminale è alterata anche nella cancerogenesi vescicale spontanea del bovino.

Tale interpretazione potrebbe spiegare i patterns lunale e microlunale da noi osservati.

L'immunoreattività intracitoplasmatica riscontrata in numerose cellule uroteliali neoplastiche si può prestare a diverse interpretazioni.

E' stato dimostrato che l'UPIIB dimerizza con l'UPIB per fuoriuscire dal reticolo endoplasmatico e raggiungere la superficie cellulare (Deng et al.,2002), quando ciò non avviene l'eterodimero UPIIB/UPIB rimane intrappolato nel citoplasma.

Quindi un'abnorme sintesi proteica potrebbe essere responsabile di un'alterata sintesi delle Ups la cui mancata dimerizzazione (nel caso specifico UPIB/UPIIB) si renderebbe responsabile dello storage citoplasmatico.

Tuttavia, si potrebbe ipotizzare che le vescicole contenenti le Ups possono accumularsi nel citoplasma a causa di alterazioni chimiche, biochimiche e submicroscopiche dei diversi organuli citoplasmatici.

Sebbene entrambi i meccanismi potrebbero spiegare i pattern d'espressione dell'UPIIB, recentissimi studi da noi condotti suggeriscono un' altra ipotesi.

Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'oncoproteina E5 del BPV-2 si lega alla ductina 16 dei complessi di giunzione alterando la permeabilità e acidificando, di conseguenza, gli organuli membranosi.

Inoltre è stato dimostrato che l' oncoproteina E5 è in grado di bloccare il trasporto delle proteine verso la superficie cellulare sequestrandole all' interno dell' apparato del Golgi.

Grazie all' ausilio del microscopio laser confocale, è stato dimostrata la presenza di E5 nel citoplasma delle cellule uroteliali neoplastiche associate alla presenza del BPV-2

Tali evidenze sperimentali potrebbero suggerire che le alterazioni di organuli citoplasmatici quali il RER e l'apparato del Golgi indotte dall' oncoproteina E5, alterano il trasporto dell'UPIIB verso la superficie cellulare..

Conclusione

L' espressione dell'UPIIB, nei tumori da noi esaminati, non sembra essere correlata con il comportamento biologico degli stessi essendo espressa in tutte le neoplasie indipendentemente dal grado e stadio.

L'insieme dei dati da noi ottenuti sembra suggerire che l'UPIIB possa essere considerato un nuovo marker di scelta per i tumori uroteliali del bovino.

Bibliografia

1. Ambrosio V, Borzacchiello G, Bruno F, Galati P, Roperto F: Uroplakin expression in the urothelial tumors of cow. *Vet Pathol* 38: 657-660,2001.
2. Borzacchiello G, Iovane G, Marcante ML, Poggiali F, Roperto F, Roperto S, Venuti A: Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *J. Gen Virol* 2003 84 : 2921-6,2003.
3. Deng FM, Liang FX, Tu L, Resing KA, Hu P, Supino M, Hu CC, Ding M, Kriebich G, Sun TT: Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. *J Cell Biol* 159: 685-94,2002.
4. Kaufmann O, Volmerig J, Dietel M: Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol* 113: 683-687,2000.
5. Ogawa K, Sun TT, Cohen SM: Analysis of differentiation-associated proteins in rat bladder. *Carcinogenesis* 5: 961-5,1996.
6. Wu XR, Manabe M, Yu Jun, Sun TT: Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I,II, and III. *J Biol Chem* 31: 19170-19179,1990.
7. Wu XR, Sun TT: Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation-dependent urothelial cell surface glycoproteins. *J Cell Sci* 106: 31-43,1993.

**CARATTERISTICHE CLINICHE E PATOLOGICHE DELLA LEUCODISTROFIA
A CELLULE GLOBOIDI NEL GATTO**

Salvadori Claudia, Arispici Mario, Cantile Carlo

Dipartimento di Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

Riassunto

Sono descritte le caratteristiche cliniche e patologiche di due casi di leucodistrofia a cellule globoidi (GCL) nel gatto. Al momento della presentazione alla visita clinica i gatti avevano età compresa tra i 3 e 4 mesi e l'anamnesi riportava la comparsa di una progressiva difficoltà alla deambulazione del posteriore dall'età di circa 4-5 settimane. L'esame neurologico mostrava paraplegia con assenza del dolore profondo, dismetria degli arti anteriori, tremori del corpo e della testa, assenza della risposta alla minaccia, del nistagmo posizionale e dei riflessi pupillari.

All'esame necroscopico le uniche lesioni osservate erano limitate al SN centrale e periferico ed erano caratterizzate da grave e diffusa perdita bilaterale e simmetrica della mielina in tutto il SNC con presenza di aggregati perivascolari di cellule globoidi, talvolta multinucleate, con citoplasma moderatamente positivo alla metodica PAS. Era evidente intensa astrocitosi nelle aree colpite e negli strati profondi della corteccia cerebrale. Alcune cellule globoidi sono state osservate nell'endonevrio dei nervi periferici campionati. L'osservazione ultrastrutturale ha mostrato la presenza di formazioni tubulari vuote di aspetto cristalloide nel citoplasma delle cellule globoidi, associate a detriti mielinici. Nel gatto la GCL è stata descritta solo in tre soggetti di cui due avevano comune discendenza. I segni neurologici erano caratterizzati da una precoce dismetria ed incoordinazione dei movimenti degli arti posteriori, seguiti da tremori generalizzati. I segni clinici e le lesioni neuropatologiche osservate nei nostri casi sono sovrapponibili a quelli descritti in letteratura e costituiscono la prima segnalazione della malattia nel gatto in Europa.

Parole chiave: gatto, leucodistrofia a cellule globoidi, neuropatologia.

Summary

Clinicopathological Features of Globoid Cell Leukodystrophy in Cats. The clinical and pathological features of two cases of globoid cell leukodystrophy (GCL) are described in cats. Both ranged from 3 to 4 months of age and developed progressive hind limb ataxia and paresis first noted at 4 to 5 weeks of age. On neurological examination, the cats were paraplegic with absence of deep pain perception in the pelvic limbs. The thoracic limbs were dysmetric and tremors of body and head were observed. Cranial nerve examination revealed absence of vestibular eye movements and decreased pupillary light reflexes. Menace responses were moderately depressed bilaterally. In both cases, on post-mortem examination no gross changes were observed and histological changes were restricted to the central and peripheral nervous system. Lesions were characterized by bilateral and symmetrical severe myelin degeneration and loss throughout the CNS with presence of moderately PAS-positive, globoid-type macrophages, often clustered around blood vessels. A marked gliosis was also observed in the affected tissue and in deep cerebrocortical areas. Globoid cells were also observed in the endoneurium of degenerate peripheral nerves. Ultrastructurally, typical tubular inclusions were recognisable in the cytoplasm of the globoid cells. In cats, GCL has been morphologically diagnosed in only two inbred domestic shorthaired kittens and in one domestic longhaired kitten. The clinical signs and the neuropathological picture were similar to the cases of our report. To the best of our knowledge, these are the first cases of feline GCL reported in Europe.

Key words: cat, globoid cell leukodystrophy, neuropathology.

**LA REATTIVITÀ MICROGLIALE ASSOCIATA AD INOCULAZIONE
INTRACRANICA DI IL12 E IL18 NELLA PATOGENESI DELLA SCRAPIE
MURINA. STUDIO PRELIMINARE**

**Mandara Maria Teresa, *Capuccini Silvia, *Ricci Giovanni, **Agrimi Umberto, **Nonno Romolo,
**Pasquali Paolo.*

*Dip. di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia.

**Dip. di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Riassunto

Le cellule microgliali rappresentano le cellule dendritiche del SNC e giocano un ruolo determinante nella patogenesi delle encefalopatie spongiformi. La IL12 prodotta dalle cellule presentanti antigene (APC), tra cui la microglia, gioca un'azione autocrina sulla microglia stessa. L'IL18, dal canto suo, prodotta anch'essa dalle APC ed essenziale per la produzione di IFN- γ , sembra esercitare un effetto autocrino sulla microglia. In questo studio abbiamo voluto indagare gli effetti della somministrazione intracranica di IL12 e IL18 sulla popolazione astrocitaria e microgliale utilizzando anticorpi anti-GFAP ed anti-F4/80, rispettivamente come marcatori astrocitari e microgliali. A questo scopo sono stati allestiti 8 gruppi di 5 topi C57BL/6 ognuno, sottoposti ad inoculazione intracranica rispettivamente con soluzione salina, IL12, IL18, ed IL12 e IL18 combinate, e sacrificati a 6h e 24h dal trattamento. Gli encefali degli animali così trattati sono stati sottoposti a sezionamenti seriali di 5 μ m in corrispondenza dei nuclei della base, talamo, cervelletto e tronco. Le sezioni sono state successivamente sottoposte a colorazione E-E ed indagine immunoistochimica con anticorpo anti-GFAP e anti-glicoproteina F4/80. Il numero degli astrociti tendeva ad aumentare sia negli encefali trattati con soluzione salina che in quelli inoculati con IL12 e IL18, prevalentemente a carico del tronco encefalico, rispetto agli encefali non trattati. Le cellule microgliali erano presenti in tutti i gruppi di animali e la loro espressione appariva fortemente aumentata in tutte le sezioni ottenute dai topi inoculati con IL12 e IL18. Gruppi di topi sovrapponibili, inoculati parallelamente con PrPsc, hanno sviluppato segni clinici in anticipo rispetto a topi non trattati. Pertanto, la somministrazione intracranica di IL12 e IL18 sembra indurre una sostanziale attivazione

della microglia e una riduzione del periodo di incubazione in corso di infezione con PrPsc.

Parole chiave: Scrapie, microglia, IL12, IL18

Summary

Intracranial administration of IL12 and IL18 and microglia reaction in the pathogenesis of mouse Scrapie. Preliminary report. Microglial cells are considered dendritic cells of the SNC and they are involved in the pathogenesis of spongiform encephalopathies. IL-12 is produced by antigen presenting-cells (APC), such as microglial cells, and plays an autocrine action on microglia. IL-18, produced by APC and necessary for the IFN- γ production, seems to play an autocrine action on microglia. In the present study we evaluated the effects of intracranial administration of IL-12 and IL-18 using immunostaining for GFAP and F4/80 as an indirect assessment of astrocytes and activated microglia. 8 groups, each of 5 C57BL/6 mice, were injected intracranially with sterile saline, IL-12, IL-18 and IL12 and IL18 combined. The animals were sacrificed at 6 and 24 hours after treatment. 5 μ m brain sections were performed from basal nuclei, thalamus, cerebellum and brain stem and submitted to immunolabelling with anti-GFAP and anti-F4/80 antibodies. Astrocytes increased in both sterile saline and the brains from animals treated with IL12 and IL18, especially in the brain stem. F4/80 positive microglia was present in all animals showing a marked increasing in mice treated with IL-12 and IL-18. Similar animal groups, submitted to scrapie infection, showed clinical signs earlier compared to uninfected animals. Therefore, the intracranial administration of IL12 and IL18 produced a marked activation of microglia and a reduction of incubation time.

Key words: Scrapie, microglia, IL12, IL18.

**REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI
DELLO SCHWANNOMA BOVINO**

*Bozzetta Elena, Pezzolato Marzia, Grattarola Carla, Banchi Cristina**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Torino
Servizio Veterinario ASL 1, Aosta

Riassunto

Nel periodo novembre 2003-marzo 2004, 5 casi di tumore del sistema nervoso periferico sono stati diagnosticati in bovine di razza Pezzata rossa, Pezzata nera, Castana e Limousine provenienti da comuni del Piemonte e della Valle d'Aosta e sottoposte a regolare macellazione. Gli animali, di età compresa tra i 6 e i 13 anni, presentavano neoformazioni singole o multiple localizzate nel cuore, a livello della parete dell'esofago e nel mediastino. All'esame ispettivo effettuato al macello, per i noduli a localizzazione cardiaca era stato formulato un sospetto di cisticercosi. Microscopicamente, le neoformazioni si presentavano come masse incapsulate, di diametro variabile tra 0.5 e 15 cm. L'esame istopatologico evidenziava la presenza di fasci intrecciati o vortici di cellule allungate, con bordi citoplasmatici indistinti, mentre altrove si osservavano aree pauci-cellulari con abbondante stroma collagene. Tali quadri microscopici potevano essere riferiti rispettivamente al pattern di tipo A e B di Antoni descritti negli schwannomi dell'uomo. L'esame immunohistochimico per l'identificazione della proteina S-100 permetteva di evidenziare immunopositività diffusa a carico del nucleo e del citoplasma di un numero variabile di cellule neoplastiche, confermando il sospetto di schwannoma (o neurofibroma).

I nostri riscontri anatomico-istopatologici sia in razze bovine autoctone che di importazione si correlano con quanto descritto in altri Paesi sullo schwannoma bovino, che è stato rilevato in larga maggioranza in bovine di età superiore ai 5 anni regolarmente macellate, e indicano il cuore quale localizzazione più frequente. Tale reperto sottolinea l'importanza dell'esame istopatologico in fase ispettiva in caso di sospetta infestazione parassitaria per poter escludere la natura neoplastica delle lesioni.

Parole chiave: schwannoma, bovino, S-100, cisticercosi

Summary

Pathological and immunohistochemical findings of bovine schwannoma. Between November 2003 and March 2004, 5 cases of peripheral nervous system tumor were diagnosed in cattle of Pezzata rossa, Pezzata nera, Castana and Limousine breeds, regularly slaughtered and coming from Piedmont and Valle d'Aosta regions. The bovine were 6 to 13 years old female and showed single lesions or multiple nodules located in the heart, esophagus and mediastinum. At macroscopic examination performed at slaughterhouse, cardiac lesions were suspected as being *Cysticercus bovis*. Gross pathological findings were encapsulated masses of 0.5 to 15 cm varying size. Histopathologically, we observed spindle-shaped cells arranged in short interwoven bundles and whorls, with indistinct cell borders, while occasionally poorly cellular areas with abundant collagen were seen. These two patterns were referred to Antoni type A and type B tissue respectively, described in human schwannoma. Immunohistochemistry for S-100 protein gave a diffuse nuclear and cytoplasmic dark brown positive staining in varying numbers of neoplastic cells, confirming a diagnosis of schwannoma (or neurofibroma).

Our findings in autoctonous and imported cattle breeds correlate with previous reports in other countries on bovine schwannoma, mainly described in female bovine older than 5 years, regularly slaughtered and with the most common site being the heart. These data highlight the importance of the histopathological examination in case of suspicion of parasitic infection, in order to exclude a peripheral nerve sheath tumor diagnosis.

Key words: schwannoma, bovine, S-100, cysticercosis.

Introduzione

I tumori del Sistema Nervoso Periferico che originano dalle cellule di Schwann (PNST) sono neoplasie relativamente comuni nell'uomo, ma raramente descritte negli animali domestici e per lo più riportate nel cane e nel bovino (1).

In quest'ultima specie sono state largamente descritte in Canada e in Australia (2, 3, 4), in bovine regolarmente macellate, e inizialmente sospette di cisticercosi, mentre più raramente sono stati riportati casi con sintomatologia clinica manifesta (5).

Nell'uomo i PNST sono suddivisi su base clinica e morfologica nell'ambito della classificazione delle neoplasie della Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in due entità distinte: lo schwannoma ed il neurofibroma. Il termine schwannoma è utilizzato per descrivere una neoplasia costituita esclusivamente da cellule di Schwann, caratterizzata da crescita lenta, presenza di una capsula e di caratteristici pattern tissutali (pattern di tipo A e tipo B di Antoni). "Neurofibroma" indica invece una neoplasia benigna poco demarcata, composta da cellule di Schwann, cellule perineurali, matrice intercellulare disorganizzata contenente fibre collagene e sostanza mucoide; fa parte, nella sua forma multipla, di una sindrome designata come Neurofibromatosi di tipo I, legata a una mutazione ereditaria del gene NF1 (6).

Negli animali i PNST presentano una morfologia più variabile, per cui sono stati inclusi nell'ambito della classificazione dell'OMS in un unico paragrafo.

Il presente lavoro descrive i reperti anatomo-istopatologici e immunoistochimici di PNST riscontrati in bovini sottoposti a regolare macellazione in Piemonte e Valle d'Aosta, in assenza di sintomatologia clinica.

Materiali e metodi

Nel periodo novembre 2003-marzo 2004, neoplasie singole o multiple localizzate nel cuore, a livello della parete dell'esofago e nel mediastino, appartenenti a bovine di razza Pezzata rossa, Pezzata nera, Castana e Limousine e di età compresa tra i 6 e i 13 anni (Tab 1), sono state

inviare per esame istologico presso il nostro istituto. Gli animali provenivano da comuni del Piemonte e della Valle d'Aosta ed erano stati sottoposti a regolare macellazione. All'esame ispettivo, il veterinario aveva formulato per i noduli a localizzazione cardiaca un sospetto di cisticercosi.

Sezioni incluse in paraffina delle neoplasie sono state sottoposte a colorazione ematossilina-eosina e a colorazione con anticorpo policlonale anti-S-100 (Dako, Carpinteria, CA, dil. 1:1000) e con anticorpo monoclonale anti-vimentina (Dako, dil. 1:100) previo smascheramento antigenico in tampone citrato 10mM (pH 6, forno a microonde a 650 Watt per 10 min.). Come anticorpo secondario sono stati utilizzati sieri anti-topo e anti-coniglio biotinilati (Dako) e la diaminobenzidina 3,3' come cromogeno. Le sezioni sono state controcolorate con Ematossilina di Mayer per 1 minuto. Come controllo negativo, gli anticorpi primari sono stati sostituiti con i rispettivi sieri normali. Sezioni di tessuto esprimenti gli antigeni in esame sono stati utilizzati come controlli positivi.

Risultati

All'esame macroscopico, le neoplasie si presentavano come masse incapsulate, di forma variabile e di dimensioni comprese tra 0.5 e 15 cm. In particolare, le neoplasie a localizzazione cardiaca si presentavano come noduli singoli, di diametro fino a 2 cm, compatti alla palpazione e di colore grigiastro. L'esame istopatologico evidenziava la presenza di fasci compatti o vortici di cellule allungate, con bordi citoplasmatici indistinti, mentre altrove si osservavano aree a scarsa cellularità, costituite da cellule più piccole, con nuclei rotondi, spazi intercellulari e stroma collagene. Tali quadri microscopici potevano essere riferiti rispettivamente al pattern di tipo A (Fig. 1) e B (Fig. 2) di Antoni descritti negli schwannomi dell'uomo. Era possibile evidenziare anche la presenza dei corpi di Verocay (Fig. 3), costituiti da nuclei cellulari disposti a palizzata e da processi cellulari eosinofili in stretta connessione. Alla periferia delle neoplasie erano inoltre presenti infiltrati linfocitari focali. Solo in un caso si evidenziava una neoplasia infiltrante, includente alcune fibre muscolari e costituita da rare cellule fusiformi e abbondante

matrice intercellulare, simile al neurofibroma. In tutte le neoplasie erano presenti rare mitosi. L'esame immunohistochimico per l'identificazione della proteina S-100 permetteva di evidenziare in tutti i casi di schwannoma diffusa e intensa immunopositività (Fig. 4) a livello nucleare e citoplasmatico di un numero variabile di cellule neoplastiche, mentre nel neurofibroma appariva a carico delle cellule di Schwann sparse nell'ambito della matrice collagene. In tutti i casi le cellule neoplastiche manifestavano positività citoplasmatica finemente granulare per vimentina (Fig. 5).

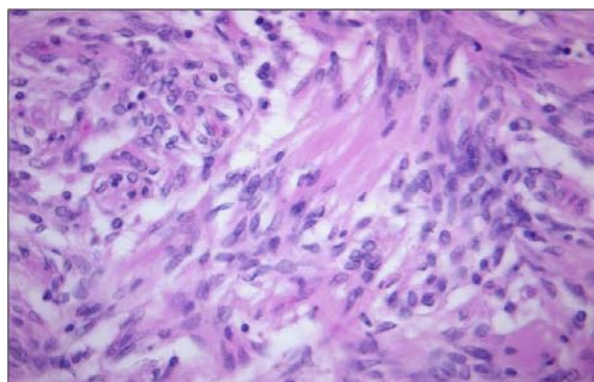


Figura 3. Schwannoma bovino, aspetto istologico dei corpi di Verocay. Ematossilina-Eosina, 200X.

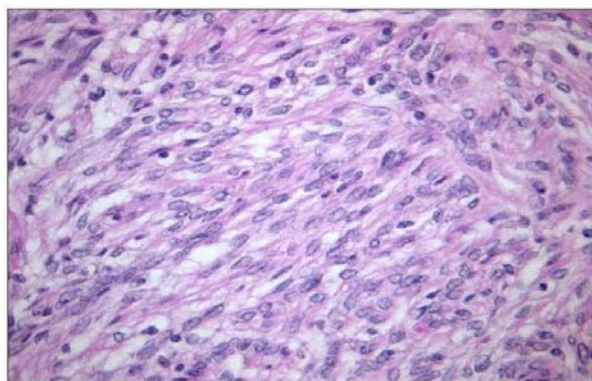


Figura 1. Schwannoma bovino, cellule fusiformi organizzate in fasci intrecciati (pattern di tipo A di Antoni), Ematossilina-Eosina, 200X.

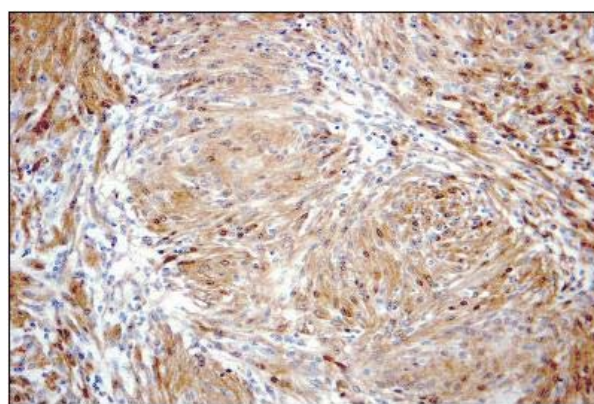


Figura 4. Immunopositività diffusa per S 100 a carico del pattern di tipo A di Antoni, metodo avidina-biotina-perossidasi, 100X.

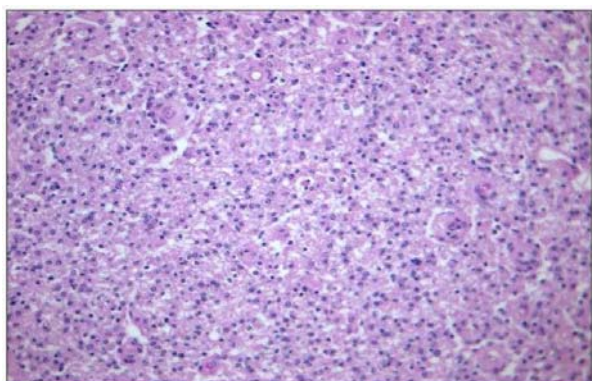


Figura 2. Schwannoma bovino, aree a scarsa cellularità (pattern tipo B di Antoni), Ematossilina-Eosina, 100X.

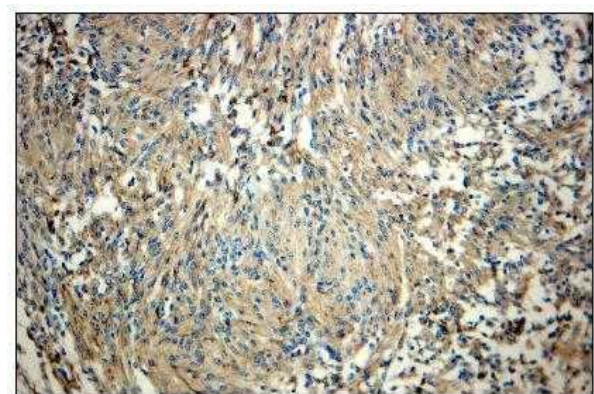


Figura 5. Immunopositività per vimentina nelle aree riferibili a pattern di tipo A di Antoni, metodo avidina-biotina-perossidasi, 100X.

CASO	SESSO	ETA'	RAZZA	SEDE	DIMENSIONI
1	F	01/01/1991	Pezzata Rossa	Cuore-Esofago	1-3 cm
2	F	01/11/1993	Pezzata Rossa	Esofago	1-4 cm
3	F	01/03/1990	Pezzata Nera	Cuore-Esofago	1-2 cm
4	F	01/11/1992	Castana	Cuore	1 cm
5	F	15/10/1997	Limousine	Cuore, esofago, mediastino	0,5 – 15 cm

Tabella 1. Dati anamnestici e sede delle lesioni.

Discussione

I tumori delle cellule di Schwann, delle cellule muscolari lisce, dei fibroblasti o di origine pericitica possono manifestare caratteristiche istologiche simili e possono essere difficili da classificare solo su base morfologica. Nel nostro studio l'assenza di indifferenziazione di tutti i quadri permetteva di porre un fondato sospetto di TNSP. In 4 casi le caratteristiche morfopatologiche delle neoplasie erano riconducibili a pattern tissutali tipici di Schwannoma, mentre in uno di neurofibroma, a differenza di quanto descritto da altri Autori (8), che hanno rilevato nella stessa neoplasia la presenza di quadri istopatologici riferibili a entrambi gli istotipi. Inoltre, la co-espressione di vimentina ed S-100 di tutti i casi, unita ai suddetti pattern tissutali, poteva essere considerata diagnostica per TNSP (7).

Conclusioni

I dati del presente studio indicano i TNSP come neoplasie di riscontro accidentale alla macellazione anche per le razze autoctone italiane; si conferma come questo tipo di tumore interessi bovine di età superiore ai 5 anni e con localizzazione prevalente a livello cardiaco, dove può facilmente indurre il veterinario ispettore a un sospetto di infestione da *Cysticercus bovis*. I nostri risultati si correlano quindi con quanto descritto negli altri Paesi e indicano come l'esame istopatologico, con l'eventuale ausilio delle

metodiche immunoistochimiche per S-100 e vimentina in caso di neoplasie meno differenziate, permetta agevolmente di porre diagnosi differenziale tra cisticercosi e TNSP.

Bibliografia

1. Stoica G., Tasca S.I., Kim H.-T (2001) "Point mutation of *neu* oncogene in animal peripheral nerve sheath tumors" Vet. Pathol., 38: 679-688
2. Canfield P. (1978) "A light microscopic study of bovine peripheral nerve sheath tumors". Vet. Path., 15:283-291
3. Bunzda A., Dukes T.W., Stead R.H. "Peripheral nerve sheath neoplasm in Canadian slaughtered cattles" Canadian Veterinary Journal 27: 268-271
4. Doughty F.R. (1977) "Incidence of neurofibroma in cattle in abattoirs in new South Wales" Austr. Veter. Journal, 53: 280-281
5. Bradshaw J., Bnazeley K., Canfield P. (2003) "Peripheral nerve sheath tumour in a cow with clinical signs consistent with vagal neuropathy" Vet. Rec., 153: 784-786
6. Gough A.W., Hanna W., Barsoum N.J., Moore J., Sturgess J.M. (1986) "Morphologic and immunohistochemical features of two spontaneous peripheral nerve tumors in Wistar rats" Vet. Pathol., 38: 679-688.
7. Weiss S.W., Langloss J.M., Enziger F.M. (1983) Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. Lab Invest. 49: 299-308
8. Tanimoto T., Ohtsuki Y. (1992) "A solitary schwannoma in the caecum of a cow" Vet Pathol 29: 81-83.

**INDAGINI ISTOLOGICHE, IMMUNOISTOCHEMICHE E
IMMUNOBIOCHIMICHE IN CAPRE CLINICAMENTE SANE PROVENIENTI DA
UN FOCOLAIO DI SCRAPIE**

Leoni Antonio, Ligios Ciriaco**, Rocca Stefano*, Madau Laura**, Pirino Salvatore*, Cancedda
Maria Giovanna**, Zucca Rosalba*, Nieddu Antonio Mario*.*

*Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico/Chirurgica Veterinaria, Facoltà
di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari.

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff", Sassari.

Riassunto

Nel corso del 2003, nell'ambito del piano di sorveglianza passiva sulle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSEs), per la prima volta in Sardegna, è stata diagnosticata istologicamente ed immunoistochimicamente la scrapie in una capra. Il soggetto proveniva da un gregge nel quale da 2 anni si manifestava una patologia polimorfa caratterizzata talvolta da sintomi neurologici e da una mortalità intorno al 20%. Sulla base della legge attualmente in vigore in Italia si è proceduto all'abbattimento di tutte le capre presenti in allevamento (n = 93). Durante l'abbattimento venivano prelevati da ciascun capo obex, linfonodi retrofaringei e tonsille. L'esame istologico dell'obex non evidenziava quadri lesivi di tipo spongiforme mentre l'esame immunoistochimico del tessuto nervoso e linfatico evidenziava la presenza di cinque soggetti nello stato pre-clinico della malattia.

Parole Chiave: scrapie, capra, PrP^{sc}, tonsilla.

Summary

Histological, immunohistochemical and immunobiochemical study on clinically-healthy goats from a scrapie affected flock. In 2003 the first case of scrapie in goats in Sardinia was confirmed by histological and immunohistochemical examination during the passive surveillance programme for Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs). The scrapie-affected goat came from a flock in which an undefined syndrome, characterized in some cases by neurological signs, and with a mortality rate of 20% had developed in the two previous years. In accordance with the Italian law for such cases, all goats from the affected flock were killed (n = 93). Obex, retropharyngeal lymph-nodes and

tonsils were collected from each goat. None of the goats showed any evidence of spongiform lesions in the obex. However, five preclinically affected goats were found by the immunohistochemical examination of the nervous and lymphoid tissues.

Key Words: scrapie, goat, PrP^{sc}, tonsil.

Introduzione

Nella capra la scrapie è descritta meno frequentemente che nella pecora, comunemente considerata più sensibile.

In Italia la scrapie è stata segnalata per la prima volta in Piemonte (Cravero et al. 1977) nell'ovino, mentre nella capra i primi casi sono stati accertati solo a partire dal 1997 (Caramelli et al. 1998). In Sardegna sinora la scrapie era stata evidenziata esclusivamente nelle pecore, seppure in molti dei focolai assieme alle pecore fossero allevate delle capre (Ligios et al 2003). Solo nel 2003, nel corso della sorveglianza passiva per le EST, è stato diagnosticato il primo focolaio di scrapie in un gregge di sole capre che, sulla base delle attuali norme di legge, sono state tutte abbattute.

Considerata la scarsità della bibliografia sulla scrapie caprina, abbiamo ritenuto interessante, oltrechè segnalare per la prima volta la malattia in capre della Sardegna, campionare tessuti nervosi e linfatici dai soggetti abbattuti al fine di descrivere, mediante indagini istologiche, immunoistochimiche ed immuno-biochimiche, gli aspetti fenotipici della malattia sia nei soggetti asintomatici che in quelli asintomatici-infetti.

Materiale e metodi

Sono state sottoposte a indagine le 93 capre di un gregge nel quale da circa due anni veniva osservata una patologia polimorfa caratterizzata da una mortalità del 20% ed in alcuni casi da una

sintomatologia neurologica. Su uno di questi soggetti veniva confermata la presenza della scrapie mediante esame istologico ed immunostochimico.

Di tale soggetto veniva conservato in formalina al 10% il cervello *in toto* nonché campioni di alcuni distretti linfatici (milza e linfonodo meseraico).

Da tutti gli animali abbattuti in base alle attuali disposizioni di legge venivano prelevati l'obex, le tonsille, i linfonodi retrofaringei e le terze palpebre. L'obex veniva diviso, con un taglio sagittale mediano, in due parti di cui una era fissata in formalina tamponata 10% per gli esami istologici assieme ad un linfonodo retrofaringeo, una terza palpebra ed una tonsilla. La restante parte degli stessi campioni veniva congelata a -20 °C per l'esame in western-blotting. Nessuno dei capi presentava sintomi neurologici al momento dell'abbattimento.

I campioni fissati in formalina erano inclusi in paraffina e le sezioni di 5 micron di spessore colorate con Ematossilina-Eosina secondo protocolli routinari. Per l'esame immunostochimico erano allestite delle sezioni su vetrini che venivano sparaffinate, reidratate ed infine trattate con acido formico per 30' e poste in autoclave per 30' a 121°C. Come anticorpo primario venivano utilizzati due anticorpi monoclonali (34C9 - Prionics, CH; F99 - VMRD, Inc., Pullman, USA); la reazione era poi evidenziata con un sistema ABC (*Avidina Biotina Complex - Vector*) e con 3,3'-diaminobenzidina.

Per l'esame in western-blotting è stato utilizzato il kit diagnostico *Prionics Check Western* (Prionics - CH) secondo le indicazioni tecniche della ditta produttrice.

Risultati

Nel capo con sintomatologia l'esame istologico del cervello permetteva di osservare una grave spongiosi a livello di numerosi nuclei (nuclei talamici e nucleo *accumbens*) (Figura 1). La vacuolizzazione neuronale era scarsa ed evidenziabile soprattutto in qualche neurone dei nuclei del midollo allungato. I patterns immunostochimici encefalici del medesimo soggetto erano caratterizzati dalla predominante presenza di depositi di PrP^{sc} sotto forma di fini granulazioni a livello del neuropilo dei nuclei del midollo allungato e del talamo. Altri patterns

evidenziati erano: depositi finemente granulari intraneuronali di PrP^{sc}, specie nei motoneuroni di numerosi nuclei del midollo allungato; positività perivasali, talvolta con aspetto di masse simili a placche (figura 2 A); positività sub-epindimale; sottili trame lineari nel neuropilo a livello del talamo (foto 2 B); accumuli perineuronali (figura 3 A) più evidenti a livello dei nuclei del vago e della formazione reticolare; grossolani depositi lineari disposti a raggiera, diramanti da un nucleo probabilmente di tipo gliare, maggiormente manifesti nella sostanza reticolare. L'esame immunostochimico della milza e del linfonodo meseraico mostrava depositi di PrP^{sc} nei centri germinativi di numerosi follicoli di entrambi gli organi.

Nel midollo allungato di tutti i soggetti asintomatici, prelevato al momento dell'abbattimento, non si osservavano lesioni di tipo spongiforme, mentre all'esame immunostochimico si potevano apprezzare in due soggetti depositi di PrP^{sc} a forma di "spot" in posizione intraneuronale (figura 4) e nel neuropilo di numerosi nuclei. Tali positività erano quasi assenti a livello del nucleo del vago, mentre il nucleo del trigemino risultava tra i più colpiti. Mancavano inoltre tutti gli altri patterns immunostochimici osservati nel soggetto sintomatico. Il tessuto linfatico (tonsilla, linfonodo retrofaringeo e III palpebra) di questi due soggetti era negativo all'esame immunostochimico.

Su altri tre soggetti si rilevava positività all'esame immunostochimico di tutti i distretti del SRL prelevati, ma non dell'*obex*. Anche in questi casi i depositi di PrP^{sc} erano confinati nei centri germinativi dei follicoli (Figura 3 B).

Le positività all'esame immunostochimico erano confermate, e davano quadri simili, con entrambi gli anticorpi.

L'esame in western-blotting degli organi linfatici e dell'*obex* delle 93 capre oggetto di studio dava esito negativo.

Organo	Western blotting (Positivo/Negativo)	Es. immunistoichimico (Positivo/Negativo)	Esame istologico (Positivo/Negativo)
Obex	0/93	2/93	0/93
Tonsilla	0/93	3/93	0/93
Linf. Retrofaringeo	0/93	3/93	Non eseguito
Linfatico III° palpebra	0/93	3/93	Non eseguito

Tabella 1. Distribuzione di PrP^{sc} all'esame immunistoichimico ed al western blotting nel tessuto linfatico e nervoso e presenza di lesioni spongiformi nell'obex di capre asintomatiche provenienti da un focolaio di scrapie.

N. Capra	Esame Immunistoichimico				Western blotting				E. istologico
	Organi				Organi				Organi
	Obex	Tonsilla	L. ret.far.	L. III pal.	Obex	Tonsilla	L. ret.far.	L. III° pal.	Obex
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	+	+	-	-	-	-	-
4	-	+	+	+	-	-	-	-	-
5	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabella 2. Rienilogo della positività nei vari distretti

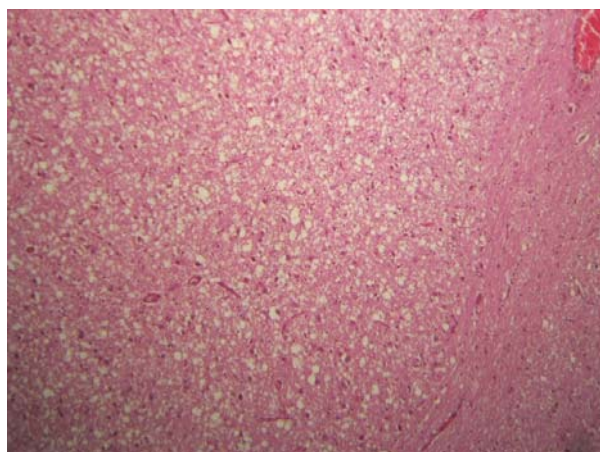


Figura 1. Capra con sintomatologia neurologica, encefalo, grave e diffusa spongiosi del nucleo *accumbens*. Ematossilina-eosina. 400 X.

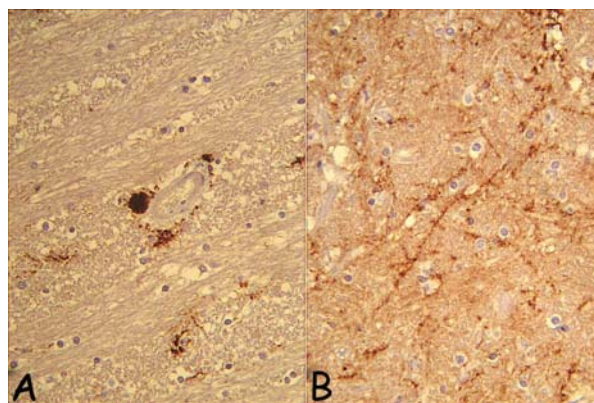


Figura 2. **A)** Capra con sintomatologia neurologica, encefalo, talamo, depositi perivasali di PrP^{sc} con aspetto simile a placche; **B)** Capra con sintomi neurologici, encefalo, talamo sottili positività lineari per PrP^{sc}, anticorpo primario F99, biotina streptavidina, 400 X

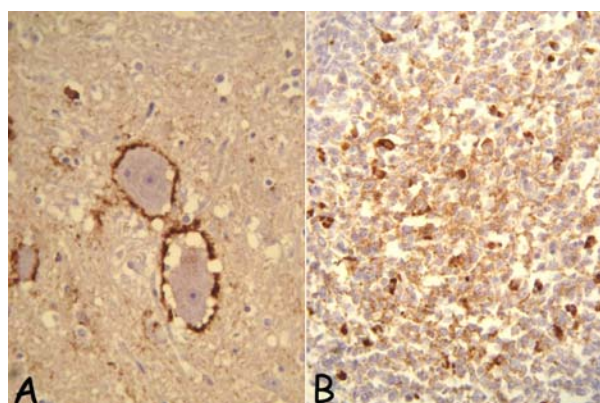


Figura 3. **A)** Capra con sintomi neurologici, marcata positività perineuronale per PrP^{Sc} ; **B)** Capra asintomatica, tonsilla, depositi di PrP^{Sc} sono presenti nel centro germinativo di un follicolo, anticorpo primario F99, biotina streptavidina. 400 X.

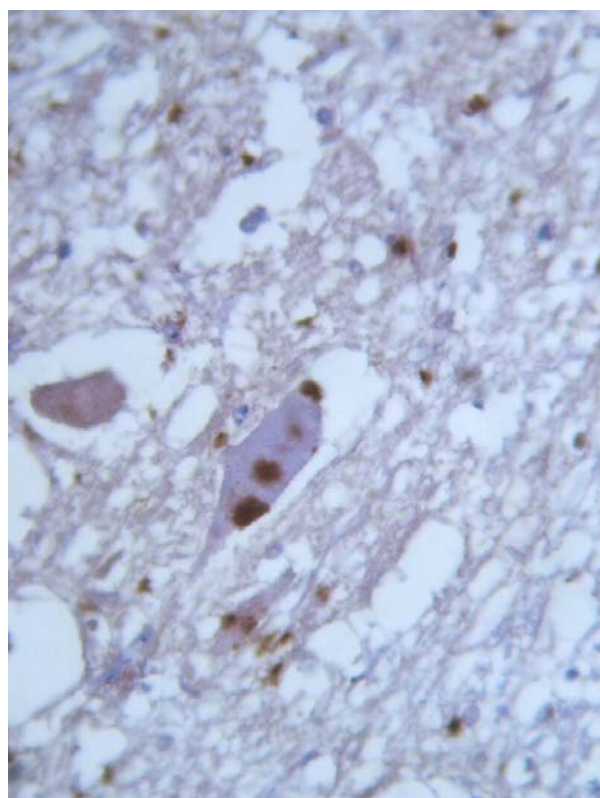


Figura 4. Capra asintomatica, cervello, obex, depositi di PrP^{Sc} sotto forma di "spot" sono presenti in posizione intraneuronale, anticorpo primario F99, biotina streptavidina. 400 X.

Discussione

I risultati del nostro studio evidenziano che, nei greggi caprini affetti da scrapie, esiste una percentuale variabile di soggetti preclinici, che nel nostro caso è stata del 5,3%. Tra questi si sono riscontrati tre capi che presentavano PrP^{Sc} in tutti i distretti del SRL esaminati, ma non nell'obex, dimostrando il coinvolgimento del sistema linfatico nella fase preclinica della malattia, così come osservato nella scrapie ovina (Schreuder et al. 1996) ed in molte altre EST. Tuttavia si è potuto rilevare come nella patogenesi della scrapie caprina talvolta non si abbia coinvolgimento del SRL (Tab 2). Tale aspetto è stato accertato anche negli ovini (Jeffrey et al., 2002) e sembra molto frequente in pecore con il genotipo ARQ/ARQ (Carta et al. 2003). In questa specie animale è stato ipotizzato che tale quadro patogenetico sia dovuto o al ceppo della scrapie implicato o al genotipo. Nella capra quest'ultima ipotesi risulterebbe meno probabile considerato che in tale specie non è stata sinora confermata una correlazione tra polimorfismi al gene della PrP e resistenza/suscettibilità alla scrapie (Billis et al. 2002).

Nella nostra indagine il wester-blotting, avendo dato esito negativo in tutti i campioni di tessuto linfatico e nervoso (compresi quelli positivi all'esame immunohistochimico), è risultato apparentemente meno sensibile. E' probabile dunque, al fine di rendere il metodo più adatto ad un utilizzo nella specie caprina, che sia necessario apportare alcune variazioni al normale protocollo di lavoro.

I patterns istolesivi osservati nel soggetto con sintomatologia sono risultati molto simili a quelli descritti nell'ovino di razza sarda con genotipo ARQ/ARQ, in particolare per quanto riguarda la gravità delle lesioni riscontrate a livello del nucleo *accumbens* (Ligios et al. 2002). I patterns immunohistochimici osservati in quest'ultimo soggetto non differiscono sostanzialmente da quanto descritto da altri autori nell'ovino (van Keulen, 1995). Al contrario nei 2 soggetti asintomatici l'aspetto morfologico del quadro immunohistochimico differisce marcatamente da quanto osservato sia nell'unica capra con sintomi clinici che negli ovini in Sardegna (Ligios et al. 2004) e nel resto dell'Europa (van Keulen, 1995). Si potrebbe dunque ipotizzare che tale differenza

sia dovuta a due diversi ceppi di scrapie. Tuttavia, per confermare questa ipotesi si rendono necessarie delle prove di caratterizzazione fenotipica del ceppo nel modello murino.

Conclusioni

Il riscontro, nel focolaio di scrapie descritto, di particolari quadri immunostochimici non corrispondenti a quelli sinora riportati per l'ovino, sollecita la necessità di ulteriori studi volti a meglio caratterizzare la scrapie nella specie caprina.

Bibliografia

1. Caramelli M., Canalone C., Eleni C., Di Guardo G., Pretella A., Troiano P., Agrimi U., Busani L., e Pocchiari M. (1998) Comparison of neuropathological findings and PrP^{res} immunolocalization in sheep and goat scrapie. Proceedings of 16th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Lillehammer, Norvegia.
2. Carta P., Ru G., Melis P., Vargiu M.P., Delogu A., Ligios C. (2003) Atti VII Convegno degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sulle Encefalopatie Spongiformi Animali. Supplemento del Progresso Veterinario 3, 15 Marzo 2004.
3. 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.
4. Billis C., Panagiotidis C. H., Vassilios P., Stamatis A., Nicolau A., Sotirios L., Papadopoulos O., Sklaviadis Th. (2002) Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *Journal of General Virology*, 83, 713-721.
5. Ligios C., Jeffrey, M., Ryder, S.J., Bellworthy, S.J. and Simmons, M.M. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal Comparative Pathology*, 127, 45-57.
6. Ligios C., Viglietti A, Carta P., Dexter G., Agrimi U, Simmons M.M. (2004) Clinicopathological findings in sheep from Sardinia showing neurological signs of disease. *The Veterinary Record* 154, 365-370.
7. Jeffrey M., Begara-McGorum I., Clark S., Martin S., Clark J., Chaplin M., González L. 2002. Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *Journal Comparative Pathology* 127, 264-273.
8. Schreuder, B.E., van Keulen, L.J., Vromans, M.E., Langeveld, J.P. & Smits, M.A. 1996. Preclinical test for prion diseases. *Nature* 381, 563.
9. Valdez R. A., Rock M.J., Anderson A. K., O'Rourke K.I. (2003) Immunohistochemical detection of prion protein in a goat with natural scrapie. *J Vet Diagn Invest*, 15, 157-162.
10. Van Keulen, L. J. M., Schreuder, B. E. C., Meloen, R. H., Poelen-van den Berg, M., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E. W. and Langeveld, J. P. M. (1995). Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Veterinary Pathology*, 32, 299-308.

**STUDIO PRELIMINARE SULL'ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA
DELL'ERITROPOIETINA E DEL SUO RECETTORE NEL TUMORE MAMMARIO
DI CANE**

Sfacteria Alessandra, Mazzullo Giuseppe, Lanteri Giovanni, De Vico Gionata, Macrì Battesimo.

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina

Riassunto

L'eritropoietina (Epo) è una citochina di basilare importanza nella eritropoiesi, la cui produzione è indotta dall'HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) in seguito a stimoli ipossici. La dimostrazione di Epo e del suo recettore (EpoR) in un'ampia varietà di cellule non ematopoietiche suggerisce che la presenza di Epo e EpoR possa essere legata ad un'attività che si spinge oltre l'eritropoiesi e che, probabilmente, rappresenta un mezzo di protezione dall'ipossia. Recentemente una elevata espressione di Epo e EpoR è stata descritta nei tumori mammari nell'uomo. Ulteriori studi condotti su colture cellulari di carcinoma mammario hanno dimostrato che l'Epo stimola la proliferazione delle cellule neoplastiche lasciando intuire un suo ruolo nella crescita tumorale. Nel tentativo di approfondire i meccanismi patogenetici del tumore mammario del cane abbiamo valutato, mediante immunocistochemica, l'espressione di Epo e EpoR in ghiandole mammarie normali e in ghiandole neoplastiche. I risultati, ancora preliminari, dimostrano che Epo e EpoR sono scarsamente espressi nelle cellule neoplastiche benigne, mentre tale immunoreattività aumenta in relazione al grado di malignità delle lesioni. L'espressione dell'eritropoietina e del suo recettore è stata dimostrata anche nell'endotelio vasale oltre che nelle cellule epiteliali suggerendo che, anche nel cane, questa citochina possa giocare un ruolo importante nell'oncogenesi. I dati ottenuti suggeriscono inoltre che, anche nel modello canino, l'ipossia sembra essere in grado di indurre un'azione autocrina e/o paracrina dell'eritropoietina che favorisca la sopravvivenza e la neovascolarizzazione tumorale.

Parole chiave: cane; tumore mammario; eritropoietina; recettore dell'eritropoietina.

Summary

Immunohistochemical expression of Erythropoietin and Erythropoietin receptor in canine mammary tumours: preliminary results. Erythropoietin (Epo) is a cytokine known to be involved in the erythropoiesis. It is produced after hypoxic stimuli by the mean of the HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). In human breast carcinoma cell lines and human breast carcinomas, Epo and EpoR expression is enhanced by hypoxia and Epo has been shown to stimulate tumour growth. These findings have suggested a role for Epo in oncogenesis. In order to better understand the mechanisms underlying oncogenesis in dogs, we evaluated whether canine mammary neoplastic lesions express both Epo and EpoR. For this purpose we performed an immunohistochemical study on mammary glands bearing different tumor types. Our preliminary results show a weak to moderate Epo and EpoR expression in healthy and dysplastic glands, being immunoreactivity enhanced as the lesion grows in severity. The reactivity of epithelial cells and endothelium suggest a role for Epo in tumour progression even in canine mammary gland. We further discuss about the role for autocrine-paracrine Epo signaling in the hypoxic survival and tumour neovascularization.

Keywords: dog; mammary gland tumour; erythropoietin; erythropoietin receptor.

Introduzione

L'eritropoietina (Epo) è un ormone glicoproteico la cui produzione, nel fegato durante la vita fetale e nel rene dell'individuo adulto, è indotta dall'HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) in seguito a stimoli ipossici; fino ad un decennio fa era conosciuta esclusivamente per la sua importanza nell'eritropoiesi. Studi successivi, condotti sia in vitro che in vivo, hanno evidenziato che l'effetto

mitogeno e antiapoptotico dell'Epo non riguarda soltanto gli eritroblasti ma può essere esteso a tutte quelle cellule che esprimono recettori funzionali e, in particolare, alle cellule endoteliali vascolari, ai neuroni, ai mioblasti e alle cellule dell'epitelio renale. L'eritropoietina ricombinante umana (rhEPO) è diffusamente utilizzata per il trattamento delle anemie in virtù dell'azione eritropoietica. Come tipico componente della superfamiglia delle citochine, Epo esercita anche altre funzioni, comportandosi come mediatore endogeno della risposta adattativa dei tessuti allo stress metabolico e limitando l'estensione del danno. Per esempio, EPO sintetizzata da astrociti ipossici può mediare il fenomeno protettivo del preconditionamento nel sistema nervoso in cui l'esposizione ad un breve, non tossico episodio di ischemia, aumenta la resistenza dei neuroni a insulti successivi. Inoltre l'EPO attenua l'apoptosi e modula la risposta infiammatoria. Molti ricercatori, negli ultimi anni, hanno evidenziato la presenza di Epo e recettori funzionali in diversi tipi di tumore (p.e. tumori pediatrici, tumori head and neck, carcinomi della mammella) suggerendo che questi utilizzino il sistema Epo/EpoR per la crescita, l'angiogenesi e la sopravvivenza all'ipossia. E' noto infatti che l'ipossia seleziona la crescita dei fenotipi tumorali più aggressivi e ne promuove la neoangiogenesi. Recentemente una elevata espressione di Epo e EpoR è stata descritta nei tumori mammari dell'uomo. Ulteriori studi condotti in vitro, su colture cellulari di carcinoma mammario, hanno dimostrato che l'Epo stimola la proliferazione delle cellule neoplastiche suggerendo che l'eritropoietina intervenga nell'insorgenza e nella progressione tumorale. L'eritropoietina canina possiede una stretta analogia molecolare (circa l'85%) con l'eritropoietina umana. Nel cane, l'eritropoietina ricombinante umana è attualmente utilizzata per la cura delle anemie da insufficienza renale e aplasia midollare di varia natura, ma sono poco rilevanti, in letteratura, i dati riguardanti l'espressione del complesso EPO/EPOR e il suo significato in corso di neoplasie. Poiché la molecola mostra le stesse attività sull'eritropoiesi già dimostrate nell'uomo, sorge spontaneo chiedersi se, anche nel cane, il suo spettro di azione non sia più ampio, se non si allarghi anche alla patologia neoplastica e se non sia necessario adottare le stesse precauzioni di

utilizzo in corso di neoplasia. Nel presente studio gli autori si propongono di valutare l'espressione di Epo e EpoR nelle lesioni spontanee, iperplastiche/displastiche e neoplastiche, della mammella di cagna e l'eventuale correlazione tra espressione di Epo/EpoR ed evoluzione neoplastica.

Materiali e metodi

Sono stati selezionati, dall'archivio della Sezione di Patologia del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria di Messina, 15 campioni di tumore mammario, già sottoposti ad indagine istopatologica di routine, comprendenti n°5 lesioni iperplastiche/displastiche e n°10 tumori maligni (4 carcinoma tubulo-papillare, 1 carcinoma solido, 1 carcinoma squamoso, 4 carcinomi complessi). Le sezioni sono state sottoposte a chiarificazione in xilolo e reidratazione in serie crescente di alcool, rivelazione dell'epitopo antigenico (mediante trattamento, 2 cicli di 5 min ciascuno, con forno a microonde a 750W in tampone citrato pH 6), blocco dell'attività perossidasi endogena con H₂O₂ 0,3% in metanolo assoluto per 30 min. e blocco delle reazioni proteiche aspecifiche con siero normale di cavallo e capra per 30 min. A tali trattamenti ha fatto seguito l'incubazione delle sezioni over night a 4°C con anticorpi (Ab) anti-Epo (*Ab policlonale da capra; clone N-19; Santa Cruz, diluizione 1:200*) e anti-EpoR (*Ab policlonale da coniglio; clone C-20, Santa Cruz, diluizione 1:300*). La specificità della reazione per EpoR è stata inoltre convalidata, sui campioni più significativi, dall'utilizzo di un anticorpo monoclonale murino (*Ab monoclonale da ibridoma di topo; R&D Systems, diluizione 1:50*). Ha fatto seguito l'incubazione per 1h a T° ambiente, con anticorpo secondario biotinilato anti-capra, topo e coniglio (*horse anti-goat, horse anti-mouse e goat anti-rabbit biotinylated IgG, Vector Laboratories*) e rivelazione con il metodo ABC (*Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories*) utilizzando il cromogeno Vector Nova Red (*Vector Laboratories*) e controcolorazione con ematossilina Carazzi. Per ogni campione sono stati eseguiti i controlli negativi con omissione dell'Ab primario e sostituzione dell'Ab primario con IgG di capra, di

topo e di coniglio non specifiche, dello stesso isotipo dell'Ab primario e alla stessa diluizione.

Risultati

I risultati, da intendersi ancora preliminari data l'esiguità dei casi esaminati, descrivono per la prima volta l'espressione di Epo e EpoR nella ghiandola mammaria di cane. Nella iperplasia/displasia, la reazione immunohistochimica per Epo è apparsa localizzata a livello dell'endotelio vascolare dei capillari interlobulari con scarsa e rara espressione nelle cellule epiteliali. Quadri simili sono stati osservati nelle lesioni francamente neoplastiche. Al contrario di Epo, l'immunoreattività per il recettore EpoR è risultata localizzata prevalentemente nelle cellule epiteliali e ha manifestato un aumento di intensità in relazione al grado di malignità delle lesioni. Nelle iperplasie/displasie la reattività per EpoR si è rivelata con una immunopositività granulare, non omogenea, finemente dispersa nel citoplasma o localizzata ad un polo della cellula, con una intensità della reazione ben documentabile nei dotti e nei lobuli iperplastici con proliferazione epiteliale più spiccata, ma poco apprezzabile nell'epitelio con alterazioni meno conclamate. Tale espressione ha mostrato un considerevole aumento nelle lesioni neoplastiche in cui l'espressione di EpoR ha coinvolto un numero maggiore di cellule epiteliali, con una forte e omogenea immunoreattività a localizzazione citoplasmatica o membranaria.

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti con il presente studio, sebbene ancora preliminari, ci permettono di concludere che, anche nel cane, l'eritropoietina potrebbe giocare un ruolo importante nell'oncogenesi. Infatti il binomio Epo endotelio vascolare/EpoR epitelio e l'aumento dell'espressione di EpoR, in relazione con il progredire della neoplasia, indicano una attività paracrina e suggeriscono che

l'eritropoietina potrebbe essere un fattore di crescita implicato nell'insorgenza e nella progressione neoplastica.

Bibliografia

1. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer *Cancer Research* 2001 61(9):3561-3565
2. Brower V. Erythropoietin may impair, not improve, cancer survival. *Nature Medicine* 2003, vol.9, n.12, p.1439
3. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T et al. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003, vol.24 n.6, pp1021-1029
4. Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A. Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer* 2002, vol.95, n.5
5. Eritropoietina e neoplasie: usare con estrema cautela. *Bollettino d'informazione sui farmaci (bimestrale del Ministero della Salute)* 2004, anno XI-n°1
6. G. Grasso, M. Buemi, C. Alafaci, A. Sfacteria, M. Passalacqua, A. Sturiale, G. Calapai, G. De Vico, G. Piedimonte, F.M. Salpietro and F. Tomasello. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 99(8):5627-5631, 2002.
7. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 2003 Jul 22;100(15):9102.

**ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLA CICLOOSSIGENASI-2 (COX-2)
IN TESSUTI MAMMARI SANI, IPERPLASTICI E NEOPLASTICI DI GATTA:
CORRELAZIONE CON PARAMETRI CLINICO-PATOLOGICI E PROGNOSTICI**

Millanta Francesca, Calandrella Michela, Lorenzi Davide, Vannozzi Iacopo, Poli Alessandro*

Dipartimento di Patologia Animale e * Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

Riassunto

Le cicloossigenasi (COX) nelle cellule neoplastiche sono state correlate con la progressione neoplastica ed il potenziale metastatico. Lo scopo del presente studio è valutare l'espressione di COX-2 nei tumori mammari felini ed eventuali associazioni con altri parametri clinico-patologici e prognostici. L'espressione di COX-2 è stata determinata mediante immunohistochimica su 7 campioni di tessuto sano, 8 iperplasie, 5 carcinomi "in situ" ed in 47 carcinomi infiltranti di gatte sottoposte ad un follow-up di 2 anni. L'espressione di COX-2 è risultata significativamente maggiore nelle lesioni neoplastiche rispetto alle forme iperplastiche ed al tessuto sano ($P < 0,001$): non è infatti stata evidenziata nel tessuto sano e nelle lesioni iperplastiche, mentre 5 carcinomi "in situ" su 5 (100%) hanno dimostrato immunoreattività seppure di bassa intensità. Nei carcinomi infiltranti l'espressione di COX-2 è stata rilevata in 45/47 casi (96%) e, nel 49 % dei casi, con elevata intensità. Non sono state evidenziate correlazioni significative con le dimensioni della lesione, l'età ed il coinvolgimento dei linfatici. L'aumentata espressione di COX-2 è risultata significativamente correlata con perdita dell'espressione del recettore per estrogeni e con presenza di recettori per il progesterone. I nostri risultati sono in accordo con uno studio preliminare effettuato su ghiandole mammarie di cagne e suggeriscono un probabile ruolo di COX-2 nella progressione neoplastica nella specie felina. Dal momento che recenti studi dimostrano come farmaci anti-infiammatori non-steroidi possano ridurre l'incidenza di tumori nell'uomo ed in modelli animali sperimentali, COX-2 potrebbe essere un target per nuove strategie terapeutiche e preventive nel carcinoma mammario della gatta.

Parole chiave: COX-2, immunohistochimica, ghiandola mammaria, gatto, prognosi.

Summary

Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in feline healthy, dysplastic and neoplastic mammary tissues: correlation to clinico-pathological parameters and prognosis. The presence of cyclooxygenase (COX) in tumour cells is linked to tumour progression and metastasis. The aim of this study is to evaluate the expression of COX-2 in feline mammary non-neoplastic and neoplastic tissues and its possible association with clinico-pathological parameters and prognosis. COX-2 expression has been determined by immunohistochemistry in 7 samples of healthy mammary gland, 8 hyperplasia, 5 "in situ" carcinomas and 47 invasive carcinomas of queens submitted to a 2-year-follow-up. COX-2 expression was significantly higher in neoplastic than in healthy tissues and hyperplastic lesions ($P < 0,001$): no immunoreactivity was detected in healthy and hyperplastic mammary glands, while 5 "in situ" carcinomas (100%) scored positive with low intensity. COX-2 expression was observed in 45 invasive carcinomas, and, among these, 49% showed high staining intensity. Elevated COX expression was not significantly associated with age, tumour size and lymphatic invasion, while was significantly correlated to absence of estrogen receptor expression and presence of progesterone receptor expression. Our results are in agreement with a previous study on canine mammary tumours and suggest a possible role of COX-2 expression in mammary tumour progression also in queens. As recent studies demonstrate that nonsteroidal anti-inflammatory drugs can reduce the incidence of cancer in human and experimental animal models, COX-2 could be a possible target for therapeutic and preventive strategies in queens bearing mammary carcinomas.

Keywords: COX-2, immunohistochemistry, mammary gland, cat, prognosis.

IL "TUMOUR GRADING" COME FATTORE PROGNOSTICO NEI CARCINOMI MAMMARI INFILTRANTI DELLA CAGNA

*Silvestri Giada, Millanta Francesca, Citi Simona *, Della Santa Daniele *, Poli Alessandro*

Dipartimento di Patologia Animale e * Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

Riassunto

Numerosi studi hanno indagato il decorso post-operatorio di cagne affette da tumore mammario, indicando come fattore prognostico il tipo istologico del tumore. Recentemente è emerso che altri parametri, quali il grado di infiltrazione dei tessuti ed il grado di anaplasia del tumore possono influenzare il tempo di sopravvivenza post-intervento chirurgico. Lo scopo del nostro studio è pertanto di valutare l'applicabilità dei criteri di grading istologico nei tumori mammari infiltranti canini ed il potenziale uso di tale sistema classificativo come indicatore prognostico. Sono stati esaminati trentanove tumori mammari maligni di cagne trattate chirurgicamente e seguite clinicamente per due anni dall'intervento. Le lesioni sono state classificate secondo i criteri del WHO (1999) ed in base alla classificazione di Elston ed Ellis (1991). Delle 39 neoplasie esaminate, 24 (62%) sono risultate carcinomi complessi, 13 (33%) carcinomi semplici di tipo tubulopapillare e 2 (5%) carcinomi semplici di tipo solido. In seguito alla applicazione dei criteri del tumour grading, 22 lesioni (57%) sono state classificate come carcinomi ben differenziati (WDCs), 11 (28%) come carcinomi moderatamente differenziati (MDCs) e 6 (15%) come carcinomi scarsamente differenziati (PDCs). Il maggior grado di indifferenziazione del tumore è risultato significativamente correlato con ridotti tempi di sopravvivenza complessiva ($P < 0.005$), mentre non sono state evidenziate altre associazioni statisticamente significative con altri parametri clinico-patologici. I nostri risultati suggeriscono il probabile ruolo prognostico del tumour grading nei carcinomi mammari infiltranti di cagna e confermano quanto precedentemente documentato circa il valore di tale parametro come indicatore prognostico nei carcinomi mammari di gatta.

Parole chiave: Tumour grading, tumori mammari, cane, prognosi.

Summary

The role of tumour grading as a prognostic indicator in canine invasive mammary carcinomas. Several studies have investigated the post-surgical prognosis of mammary tumours in bitches and many of these indicate tumour type as an independent prognostic factor. There is some evidence that other histopathologic features, such as the degree of infiltration and the grade of malignancy may affect the prognosis. The aim of our study was to apply histological grading to canine invasive mammary tumours and to evaluate its usefulness as a prognostic indicator. Thirty-nine malignant mammary lesions of bitches surgically treated and clinically followed-up were considered. The lesions were classified according to the WHO classification (1999) and according to the Elston and Ellis criteria (1991). Of the 39 tumours examined, 24 (62%) were complex carcinomas 13 (33%) were simple, tubulopapillary carcinomas, while 2 (5%) were simple carcinomas of solid type. After the application of the tumour grading criteria, 22 lesions (57%) were classified as well differentiated carcinomas (WDCs), 11 (28%) as moderately differentiated carcinomas (MDCs) and 6 (15%) as poorly differentiated carcinomas (PDCs). Increasing tumour grade of malignancy was significantly correlated to shorter overall survival ($P < 0.005$), while no other associations between clinicopathological parameters and prognosis were observed. Our results suggest the possible role of tumour grading as a prognostic indicator in bitches bearing mammary carcinomas and confirm previous studies on the prognostic significance of this grading system in feline mammary carcinomas.

Key words: tumour grading, mammary tumours, dog, prognosis.

PANSTEATITE FELINA ASSOCIATA A TUMORE PANCREATICO

Fabbrini Fabrizio[°], Anfrey Pascal[°], Viacava Paolo[#], Abramo Francesca*

[°] Libero Professionista, Milano

[#] Dipartimento di Oncologia, Divisione di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Pisa
Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Pisa

Riassunto

La pansteatite felina è una malattia rara su base nutrizionale. La steatonecrosi consegue ad ossidazione lipidica degli adipociti per carenza di vit E. Viene riportato per la prima volta un caso di pansteatite conseguente a tumore pancreatico in un gatto siamese, maschio di 11 anni. Il gatto era stato visitato in precedenza per un ascesso in prossimità della coda che, dopo terapia locale, non tendeva alla guarigione. Per la comparsa di nuovi noduli il gatto era stato anche sottoposto a terapia antibiotica sistemica ma dopo un apparente miglioramento si erano verificate recidive multiple. Alla visita erano presenti ipertermia e ottundimento del sensorio; eritema, noduli, ampie ulcere e fistole drenanti materiale simil-caseoso erano disseminati su dorso e fianchi. Nella lista delle diagnosi differenziali si consideravano infezioni batteriche inusuali/atipiche, micosi profonde, pannicolite/steatite. L'ecografia addominale rilevava una massa suggestiva di neoplasia pancreatico. Per l'aggravarsi delle condizioni generali è stata effettuata l'eutanasia. All'esame post-mortem erano presenti noduli giallastri disseminati sull'omento, una massa lobulata sulla testa del pancreas e noduli metastatici sul fegato. All'esame istologico la neoplasia, costituita da proliferazione di cellule epiteliali in nastri e strutture simil-duttali, è stata classificata come carcinoma pancreatico duttale. Nelle biopsie cutanee si rilevavano focolai multipli coalescenti di steatonecrosi e aree diffuse di pannicolite. La necrosi coinvolgente il sottocute si estendeva in superficie protendendo dalle ulcere/fistole come materiale simil-caseoso. Si ipotizza che i focolai di steatonecrosi rappresentino l'effetto a distanza di lipasi liberate in seguito ad alterazioni strutturali del pancreas. Gli autori suggeriscono di sostituire il termine di pansteatite con steatonecrosi sottocutanea per richiamare la patogenesi della malattia.

Parole chiave: Carcinoma duttale pancreatico, gatto, lipasi, pansteatite, steatonecrosi.

Summary

Feline pansteatitis associated with a pancreatic tumour. Feline pansteatitis is a rare nutritional disease due to vit E deficiency. We describe for the first time a case of pansteatitis due to a pancreatic tumour in a 11-year-old, male, siamese cat. The cat had been previously treated for abscessual nodules with antibiotic therapy without any improvement. At clinical examination the cat was febrile and depressed. Erythema, nodules, ulcers and sinuses with caseous discharge were disseminated on the dorsum and flanks. The list of differential diagnosis included unusual/atypical infections, deep mycoses and panniculitis/steatitis. Abdominal echography showed a mass on the head of the pancreas. Due to progressive worsening of general condition, euthanasia became necessary. At necropsy a pancreatic neoplasia was present with liver metastasis. Yellowish nodules were disseminated on the omentum. Histologically the neoplasia was diagnosed as ductal pancreatic carcinoma for the ribbon-like and duct-like epithelial proliferation. Skin biopsies showed multiple coalescent foci of steatonecrosis with diffuse panniculitis. The fat necrosis was primarily in the subcutis extending toward the surface. For the first time a case of cutaneous nodular diffuse steatonecrosis is described.

Key words: Cat, ductal pancreatic carcinoma, lipase pansteatitis, steatonecrosis.

I TUMORI NEI GATTI NEL VENTENNIO 1984-2003: 1696 CASI

Marcato Paolo Stefano, Bacci Barbara

Dipartimento di Sanità pubblica veterinaria e Patologia animale. Sezione di Patologia generale e Anatomia patologica. Facoltà di Medicina Veterinaria. Alma mater studiorum – Università di Bologna

Riassunto

Il materiale archiviato oggetto di studio è rappresentato da 1696 neoplasie riscontrate in 3682 gatti mediante esami autoptici e biotici; i campioni provenivano quasi esclusivamente da animali della provincia di Bologna, in un periodo compreso fra il 1984 e il 2003. Per la classificazione delle neoplasie si è adottato lo schema proposto per i tumori animali dalla WHO-IHCTDA. Tra le varie patologie diagnosticate nel ventennio spiccano nettamente per incidenza le malattie neoplastiche, che rappresentano il 46,06% dei casi. L'età dei soggetti al momento della diagnosi variava da pochi mesi a 22 anni, con maggiore incidenza a 10 anni (13,3%). Non sembra esserci una correlazione significativa fra sesso e sviluppo delle neoplasie, eccezion fatta per i tumori mammari, che sono più frequenti nelle femmine intere piuttosto che nelle femmine sterilizzate e nei maschi. Il comportamento biologico delle neoplasie risulta prevalentemente maligno (66,27%), e le neoplasie implicate sono rappresentate dai carcinomi (44,87%), a cui seguono i fibrosarcomi (14,03%) e i linfomi (7,37%) di tipo multicentrico e intestinale. Nel corso dei 20 anni considerati i carcinomi hanno mantenuto la prima posizione e hanno subito un aumento progressivo nel tempo; il considerevole aumento dei casi di fibrosarcoma nel ventennio considerato (13,02% nel primo decennio e 86,98% nel secondo su un totale di 238 casi) è relativo ad un particolare tipo di questa neoplasia correlata alla sede vaccinale (sarcoma post-vaccinale); le neoplasie emolinfopoietiche hanno conservato nel tempo la terza posizione, con un picco massimo nel 1988. Gli organi sede primaria d'insorgenza sono costituiti dalla mammella (36,44%), dalla cute (35,85%) e dall'intestino (5,54%).

Parole chiave: tumori, gatti, carcinomi, fibrosarcomi, linfomi.

Summary

Tumours in cats. A 20 years case study. The population of this case study consisted of 3682 cats, examined by biopsy or necropsy, during a 20-year period, from 1984 to 2003. A total of 1696 primary neoplasms were diagnosed, and classified according to WHO-IHCTDA. Among various pathologies, the most common is the neoplastic one, which represents 46,06% of all cases. The age range of affected cats varies from few months to 22 years, with a mean of 10 years. There is no significant association between sex and development of tumours in cats, with the exception of mammary cancer, which is more prevalent in intact females than in spayed females or in males. The greater number demonstrated malignant behaviour (66,27%), and the main types were carcinomas (44,87%), fibrosarcomas (14,03%) and lymphomas (7,37%), most of them systemic or intestinal. During this period, carcinomas have always been the most common, and have increased progressively. Increasing occurrence of fibrosarcomas was associated, from 1994 to 2003, with vaccination site (vaccine-associated sarcomas). The haemolymphatic neoplasms had the third position during all years. The main organs involved with development of cancer were breast (36,44%), skin (35,85%) and intestine (5,54%).

Key words: tumours, cats, carcinomas, fibrosarcomas, lymphomas.

Introduzione

Il contributo originale di questo lavoro è consistito nel rivalutare da un punto di vista diagnostico classificativo e statistico una casistica di neoplasie del gatto archiviata in 20 anni (1984-2003) presso la Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Alma Mater Studiorum-Università di Bologna.

Materiali e metodi

Il materiale archiviato oggetto di studio è rappresentato da 1696 neoplasie riscontrate in 3682 gatti mediante esami autoptici e bioptici.

I campioni provenivano per il 71,26% da materiale di tipo chirurgico (asportazioni, biopsie), mentre il restante 28,74% da materiale autoptico.

I campioni di tessuto erano stati fissati in formalina di Carson e poi inclusi in paraffina, e le sezioni colorate con Ematossilina-Eosina e, in caso di necessità di approfondimenti diagnostici, colorate con altri metodi istologici (tricromica di Masson, Gomori, Van Gieson), istochimici (Verde di Metile-Pironina, P.A.S., Alcian blu, Blu di Toluidina), ed immunoistochimici (AB-PAP).

Numerosi casi sono stati processati istologicamente ex-novo in quanto non ritenuti adeguati per la diagnosi a causa di insufficienze nel numero delle sezioni, nelle metodiche applicate o a causa dello smarrimento o deterioramento delle preparazioni istologiche pur in presenza di campioni di tessuto fissati e/o inclusi ancora idonei per la processazione.

Per la classificazione delle neoplasie si è adottato lo schema proposto dalla WORLD HEALTH ORGANISATION nella INTERNATIONAL HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF TUMOURS OF DOMESTIC ANIMALS (1).

Per ogni caso si sono registrate, quando possibile, la razza, il sesso, l'anamnesi, la descrizione necroscopica, la diagnosi istologica e le eventuali lesioni metastatiche.

Per i vari tipi di neoplasia si è considerata la rilevanza statistica sia nella sua evoluzione nel corso del ventennio sia in linea comparativa con le statistiche analoghe reperibili in letteratura.

Risultati

Sulle varie patologie, per le quali nel ventennio sono stati esaminati 3682 gatti, spiccano nettamente per prevalenza le malattie di tipo neoplastico con 1696 casi (46,06%).

Per 41/1696 casi non è stato possibile formulare una diagnosi precisa per l'atipicità dei reperti o per motivi tecnici (insufficienza quali-quantitativa dei campioni).

L'età dei soggetti al momento della diagnosi variava da pochi mesi a 22 anni. Malauguratamente il dato non era noto

nell'11,97% dei casi. Risulta significativo il dato sull'incidenza delle neoplasie nel primo anno di vita (2,42%), che risulta superiore sia rispetto al secondo (1,30%), che al terzo (1,47%) e al quarto (1,77%) anno. L'età in cui si è manifestata l'incidenza maggiore è quella di 10 anni. Oltre i 2/3 dei casi è stato rilevato a un'età compresa fra i 9 e i 12 anni.

La nettissima prevalenza (62,62%) delle neoplasie nei soggetti di sesso femminile rispetto ai maschi (28,83%), si spiega con l'elevata frequenza delle neoplasie mammarie. In particolare le femmine intere (50,65%) risultavano più colpite rispetto alle femmine strilizzate (11,97%) ai maschi interi (20,93%) e ai maschi castrati (7,90%).

Si conferma che nei gatti sono nettamente più frequenti le neoplasie a comportamento maligno (81,78%). Per quanto attiene ai tipi, i carcinomi (44,87%) sono il tipo di neoplasia maligna più rappresentato e in prevalenza si diagnosticano in sede mammaria. Seguono i fibrosarcomi (14,03%) che hanno prevalentemente sede nella cute. In terza posizione si riscontrano i linfomi (7,37%) che in prevalenza sono di tipo multicentrico (46,4% dei linfomi) o alimentare (40%).

Gli organi sede si sviluppo neoplastico sono in primo luogo la mammella (36,44%), la cute (35,85%) e l'intestino (5,54%). Seguono altre sedi di insorgenza: il cavo orale (3,12%), le ossa (1,30%), i polmoni (1,06%) e le cavità nasali (1%). Le neoplasie sistemiche (linfomi multicentrici) raggiungono il 5,54%.

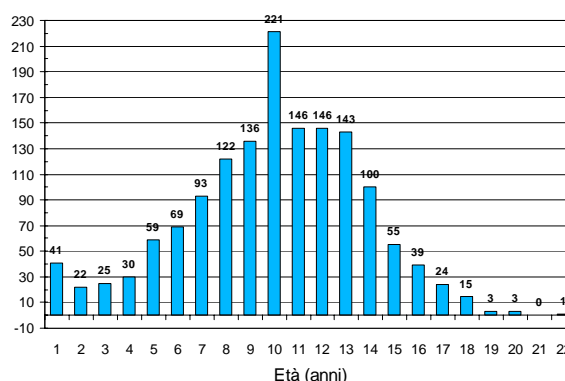


Tabella 1. Distribuzione delle neoplasie per età.

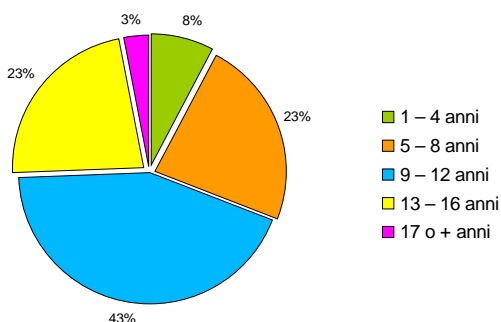


Tabella 2. Distribuzione delle neoplasie per fascia d'età

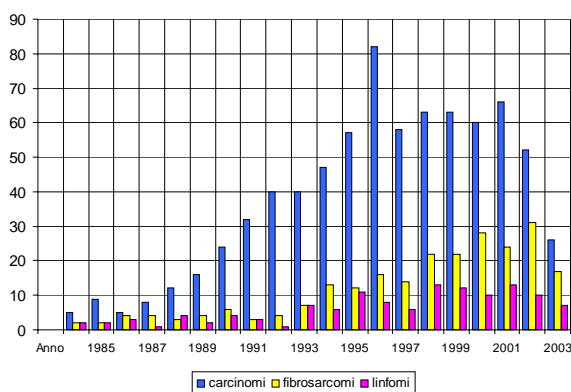


Tabella 3. Prevalenza delle principali neoplasie nei 20 anni

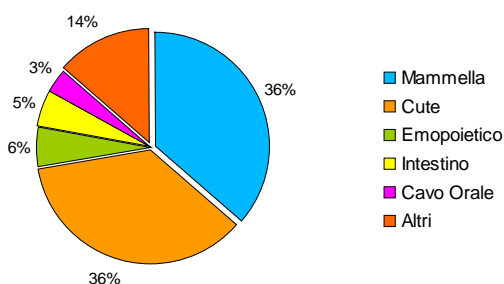


Tabella 4. Organi di origine delle neoplasie

Discussione

Dalla letteratura si deducono dati statistici molto vari sull'incidenza delle neoplasie feline in riferimento a singoli organi e sistemi. Per le **neoplasie mammarie** si registra un'oscillazione dal 5 al 20% sul totale delle neoplasie (2,3,4), mentre nella nostra casistica superano il 36%. La netta prevalenza delle forme maligne concorda

con i dati della letteratura, dove i tumori maligni sono descritti nel 75% dei casi(1,5).

Per le **neoplasie della cute** la letteratura riferisce un'oscillazione dal 15 al 47%(4). I tumori cutanei più frequenti sono: il fibrosarcoma (11,3-43,1%), da noi diagnosticato invece nel 38,82% dei casi; i tumori delle cellule basali (14,4-26,1%)(2), mentre nella nostra casistica rappresentano l'1,94%; i carcinomi (7,2-17,4%), in particolare di tipo squamoso, da noi diagnosticati nel 14,31% dei tumori cutanei (5).

Nel corso degli anni considerati i carcinomi hanno mantenuto la prima posizione e hanno subito un aumento progressivo nel tempo. Il considerevole incremento dei casi di fibrosarcoma nel ventennio (13,02% nel primo decennio e 86,98% nel secondo, su un totale di 238 casi) è sicuramente correlato alla sede vaccinale. Gli anni in cui si registra l'aumento di tali neoplasie corrispondono in effetti agli anni in cui la vaccinazione è diventata sistematica a livello ambulatoriale.

Le **neoplasie del sistema emopoietico** rappresentano il 18-30% delle neoplasie feline (1,2,6,7), mentre nella nostra indagine costituiscono il 7,37% sul totale delle neoplasie. Le percentuali delle varie forme anatomiche sono: 40% intestinali, 46,4% multicentrici, 9,6% cutanei, 4% renali.

Per quanto riguarda il sesso dei soggetti in esame, non sembra esserci una correlazione significativa fra sesso e sviluppo di neoplasie, eccezion fatta per i tumori mammarie, che sono più frequenti nelle femmine intere piuttosto che in quelle sterilizzate e nei maschi.

Conclusioni

Il dato comparativo più rilevante emerso da questa indagine su un ventennio di diagnostica oncologica felina riguarda la frequenza del tipo di neoplasie. Mentre nel trattato di Meuten (1) le neoplasie mammarie sono riportate al terzo posto per frequenza dopo le neoplasie cutanee e i linfomi, nella nostra casistica le neoplasie mammarie sono invece al primo posto (36,44%) seguite a breve distanza dalle neoplasie cutanee (35,85%) e dai linfomi (7,37%).

In particolare si segnala la relativamente bassa frequenza dei linfomi, mentre secondo la letteratura e in particolare nel trattato di Meuten i linfomi sono considerati la più frequente

neoplasia dei gatti. Il dato sui linfomi è certamente molto difforme rispetto a quanto riporta la letteratura e non può essere soggetto a riserve.

Invece per quanto riguarda le neoplasie mammarie e cutanee, la loro netta prevalenza potrebbe essere stata influenzata dalla sempre maggiore affluenza che si è verificata in questi ultimi anni di biopsie di mammella e cute con richiesta di diagnosi soprattutto riguardanti tumori, mentre il conferimento di casi completi da sottoporre a esami necroscopici, e perciò con possibile reperimento di casi di neoplasia nelle più varie sedi, non è aumentato proporzionalmente.

Bibliografia

1. D.J. Meuten, "*Tumors in domestic animals*". Ed. Iowa State Press, 2002.
2. P.S. Marcato, "*Patologia Sistematica Veterinaria*". Ed. Edagricole, 2002.
3. G. Sarli, "*Gli elementi di prognosi nei tumori mammari maligni della cagna e della gatta*". Veterinaria, n°1, Anno 11, 1997.
4. C.G. Couto e A.S. Hammer, "*Oncology*". In: "The cat disease and clinical management". Ed. Churchill Livingstone, 1994.
5. W.A. Priester e F.W. McKay, "*The occurrence of tumors in domestic animals*". In: Natl. Cancer Inst. Monogr., n°54, 1980.
6. M. Finazzi, G. Sironi, M. Caniatti, "*Tumori cutanei dell'epidermide e degli annessi*". In: "*Diagnostica istologica dei tumori negli animali*". Fond. Iniz. Zooprof. Zootec., Brescia, 1997.
7. J. Morris, J. Dobson, "*Small Animal Oncology*". Ed. Blackwell Science, 2001.

**STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO DELL'ESPRESSIONE DELLA
GLICOPROTEINA P NEL MASTOCITOMA CUTANEO CANINO IN FUNZIONE
DEL GRADO ISTOLOGICO**

Rossetti Enrica, Petterino Claudio, Drigo Michele, Castagnaro Massimo

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina
Veterinaria

Università degli Studi di Padova, AGRIPOLIS, Legnaro (PD)

Riassunto

Il mastocitoma cutaneo canino rappresenta una delle neoplasie che frequentemente richiedono un trattamento chemioterapico oltre che chirurgico. Uno dei fenomeni più importanti nel corso di terapia antineoplastica è l'insorgere della resistenza conseguente all'espressione del gene MDR1 codificante per la glicoproteina P (Pgp). Lo scopo di questo lavoro è lo studio del pattern di espressione della Pgp nel mastocitoma e della possibile correlazione dei valori ottenuti con il grado istologico. I preparati ottenuti da 42 casi di mastocitoma cutaneo canino sono stati classificati secondo i criteri diagnostici standard proposti dalla WHO e differenziati nei tre gradi istologici. I 42 casi risultano così suddivisi: 24 casi di mastocitoma di I grado, 9 di II grado, 9 di III grado. La positività alla reazione immunocistochimica, impiegando l'anticorpo monoclonale C494, è stata valutata contando il numero di cellule positive a 400X. L'impiego di strumenti statistici ha consentito di determinare l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione della Pgp ed il grado istologico. Esistono inoltre, relativamente alla percentuale di espressione della Pgp, differenze statisticamente significative esclusivamente tra grado istologico I e III e II e III. La rilevanza delle informazioni ottenibili con l'indagine immunocistochimica per la Pgp implica la possibilità, nell'eventuale conferma dei dati ottenuti con successivi studi di follow up, di impiego routinario della metodica di individuazione della proteina associata all'istopatologia diagnostica del mastocitoma cutaneo canino.

Parole chiave: Glicoproteina P, MDR, cane, mastocitoma cutaneo, grado istologico, chemioterapia.

Summary

Immunoistochemical detection of p-glycoprotein (pgp) in canine cutaneous mast cell tumor and correlation with the histological grading system. Canine cutaneous mast cell tumor represents a malignant neoplasm which frequently needs a combination of surgical and chemotherapeutical treatment approach. One of the most frustrating aspect is the development of multidrug resistance (MDR) due to the expression of MDR1 gene codifying P-glycoprotein (Pgp). The aim of this study was to determine and describe the pattern of expression of Pgp and find out any relations with the histologic grade of canine mast cell tumor to suggest routine evaluation for Pgp expression as an MDR marker. Tissue sections from 42 cases of canine mast cell tumor were submitted to our laboratory, classified and graded according to WHO diagnostic criteria. Immunohistochemical staining was performed using mouse monoclonal antibody C494 and the positive reaction was evaluated in 10 areas hpf. Statistical analysis of data was performed to evaluate the results. Our results indicate a direct relation between Pgp expression and histologic grade of canine mast cell tumor. Future follow up study after chemotherapy protocol would be extremely useful to suggest a routine immunohistochemical evaluation for Pgp as a MDR marker.

Key words: P-glycoprotein, MDR, dog, cutaneous mast cell tumour, histologic grade, chemotherapy.

Introduzione

La glicoproteina P (Pgp) è una proteina transmembranaria con molteplici funzioni nel tessuto normale, prevalentemente di tipo secretorio [1]. Nelle neoplasie la Pgp è uno dei

fattori responsabili della regolazione del trasporto intracellulare dei farmaci con azione anti-neoplastica e l'instaurarsi del fenomeno della resistenza multipla (MDR multidrug resistance), per il quale un'ampia varietà di composti antineoplastici risultano inefficaci sembra essere infatti attribuito ad un accumulo intracitoplasmatico di Pgp [2-5]. Il pattern di espressione di questa proteina nei tumori spontanei del cane è stata studiata da Ginn (1996) [6] tuttavia l'impiego della Pgp come fattore prognostico è stato per ora osservato solo nel linfoma del cane [7]. Relativamente al mastocitoma non è ancora chiaro se l'espressione della Pgp possa o meno essere correlata con il grado istologico [8] e/o con l'eventuale trattamento chemioterapico. E' stato invece dimostrato dagli autori, un significativo aumento dell'espressione della Pgp nelle neoplasie mammarie in funzione dell'aggravarsi della malignità, il calcolo poi del punto di cut-off assume una primaria importanza fine di valutare l'impatto clinico dei dati ottenuti [9].

Il mastocitoma cutaneo canino rappresenta la neoplasia cutanea maggiormente frequente nel cane con un'incidenza del 20% [10-11]. L'utilità della chemioterapia in questa neoplasia è tuttora oggetto di discussione in oncologia veterinaria e l'opportunità di definire l'esistenza di una relazione tra grado istologico ed espressione della Pgp potrebbe essere uno dei criteri aggiuntivi per impostare un protocollo chemioterapico. Fra le ultime terapie riportate come efficaci sono comprese quelle in cui il protocollo prevede l'impiego di vinblastina, lomustina e prendnisolone con risultati preliminari incoraggianti (Hershey et al., 2003, comunicazione personale).

I parametri prognostici per il mastocitoma sono: localizzazione, segnalamento, sindromi paraneoplastiche, stadiazione, grado istologico, recidive, ritmo di crescita AgNORs (Argyrophilic nucleolar straining organizing regions), ploidia, PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen) e c-kit [12].

In base ai dati disponibili l'opportunità di definire l'esistenza di una relazione tra grado istologico ed espressione della Pgp potrebbe essere uno dei criteri aggiuntivi per impostare un protocollo chemioterapico.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su prelievi di noduli cutanei fissati in formalina ed inclusi in paraffina provenienti da 42 soggetti di età compresa tra i 2 ed i 14 anni (Tab.1). Le sezioni di tessuto dello spessore di 4 µm colorate secondo la metodica standard ematossilina-eosina e classificate secondo i criteri diagnostici dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) [13].

Immunoistochimica

Sezioni di 3 µm, dopo le procedure di smascheramento antigenico ed eliminazione di reazione aspecifiche, sono state poi incubate per 60 minuti con l'anticorpo primario monoclonale anti-Pgp C494 (Signet Laboratories, Dedham, MA, USA) diluito 1:100 in PBS, poi con anticorpo secondario per 30 minuti, utilizzando il sistema EnVision+™ (DAKO Cyomation, Carpinteria, CA, USA). È stato utilizzato il cromogeno 3,3' diaminobenzide tetraidrocloruro (DAB SK-4100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) per 3 minuti e la controcolorazione è stata eseguita con ematossilina di Harry per 10 secondi. Come controlli positivi sono stati impiegati campioni di rene di cane e carcinoma epatocellulare umano.

Valutazione semiquantitativa ed analisi statistica

L'analisi semiquantitativa è stata eseguita attribuendo alla percentuale di cellule positive in 10 campi microscopici a 400X i punteggi: 0=0% di cellule positive; 1=<10% di cellule positive; 2=11-50% di cellule positive; 3=>50% di cellule positive [8].

La correlazione tra grado istologico e percentuale di positività alla Pgp è stata valutata impiegando il test non parametrico di Spearman. Per verificare l'esistenza di differenze statisticamente significative tra grado istologico diverso è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney.

Risultati

Dei 42 casi esaminati 24 casi sono stati classificati come mastocitoma di I grado, 9 di II grado, 9 di III grado. La metodica immunoistochimica impiegata ha dato i seguenti risultati: 15/24 casi di mastocitoma di I grado, 8/9 di II grado, 9/9 di III grado sono risultati positivi (figure 1-3). Nei campioni esaminati la Pgp appare prevalentemente localizzata all'interno del

citoplasma dei mastociti neoplastici secondo un pattern prevalentemente omogeneo, occasionalmente membranario con positività variabile da moderata ad intensa. Disseminatamente anche i granulociti eosinofili apparivano positivi. La correlazione tra grado istologico di espressione della Pgp è risultata

essere statisticamente significativa (Rho=0.58; P<0.001). Esistono inoltre, relativamente alla percentuale di espressione della Pgp, differenze statisticamente significative esclusivamente tra gruppi di grado istologico I e III (U=17.50; P<0.01) e II e III (U=7.0; P=0.002).

CASO	ETÀ	SESSO	RAZZA	GRADO	SEDE
1	5	F	Boxer	I	REGIONE FIANCO DESTRO
2	10	M	Boxer	I	REGIONE SCROTALE
3	10	M	Labrador retriever	I	REGIONE FIANCO
4	2	-	Boxer	I	REGIONE COSCIA DESTRA
5	8	Fc	Boxer	I	REGIONE COSCIA DESTRA
6	6	F	Boxer	I	REGIONE STERNALE
7	8	M	Setter inglese	I	REGIONE SCROTALE
8	3	M	Golden retriever	I	REGIONE COSCIA SINISTRA
9	8	F	Setter inglese	I	REGIONE COSCIA SINISTRA
10	5	F	Boxer	I	REGIONE POPLITEA
11	7	M	American Staffordshire	I	ARTO ANTERIORE DESTRO
12	8	F	Boxer	I	REGIONE GINOCCHIO
13	4	F	Boxer	I	ARTO ANTERIORE SINISTRO
14	8	M	Bassotto tedesco	I	REGIONE PARAPENIENA
15	7	-	Meticcio	I	REGIONE ORECCHIO SINISTRO
16	-	F	Siberian husky	I	REGIONE GOMITO
17	10	M	Meticcio	I	REGIONE STERNALE
18	8	Mc	Meticcio	I	REGIONE STERNALE
19	10	M	Meticcio	I	REGIONE PARAPENIENA
20	8	M	Boxer	I	ARTO POSTERIORE
21	6	M	Meticcio	I	REGIONE COSTALE
22	-	M	Meticcio	I	-
23	11	M	Yorkshire terrier	I	REGIONE STERNALE
24	7	M	Labrador retriever	I	CAPEZZOLO
25	8	M	Boxer	II	REGIONE TESTA
26	7	F	Boxer	II	METATARSO SINISTRO
27	8	F	Boxer	II	REGIONE LATERALE TORACE
28	14	F	Meticcio	II	REGIONE AVAMBRACCIO
29	10	M	-	II	REGIONE DORSO
30	12	M	Meticcio	II	REGIONE POPLITEA
31	12	M	Meticcio	II	REGIONE TORACE
32	8	Mc	Setter inglese	II	REGIONE PERIORBITALE
33	6	M	Dobermann	II	REGIONE SCROTALE
34	8	F	Boxer	III	REGIONE TRONCO
35	-	F	Meticcio	III	REGIONE COSCIA
36	14	M	Labrador retriever	III	REGIONE CARPO
37	7	M	Meticcio	III	REGIONE DORSO
38	10	M	Boxer	III	PIEDE SINISTRO
39	10	M	Meticcio	III	ARTO POSTERIORE
40	12	F	Cocker spaniel	III	REGIONE CAUDALE
41	10	M	Dobermann	III	REGIONE COSTALE
42	8	M	Boxer	III	REGIONE LATERALE COLLO

Tabella 1: casi di mastocitoma presi in esame

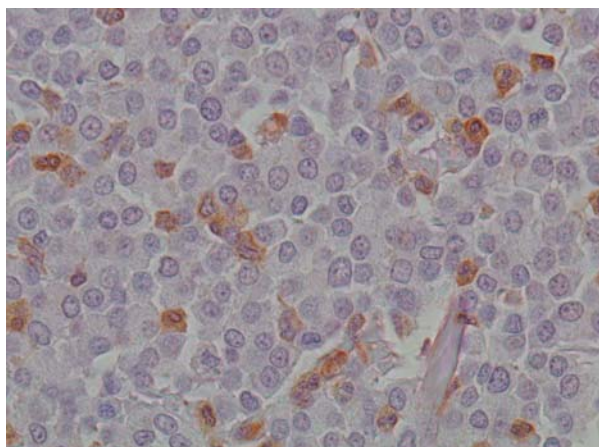


Figura 1 :mastocitoma I grado (ingrandimento 10X)

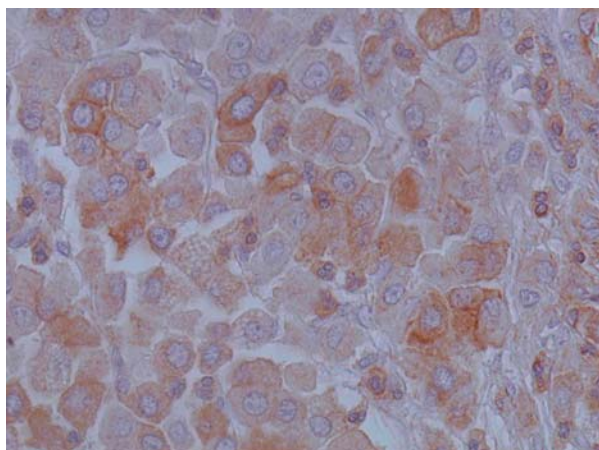


Figura 2: mastocitoma II grado (ingrandimento 10X)

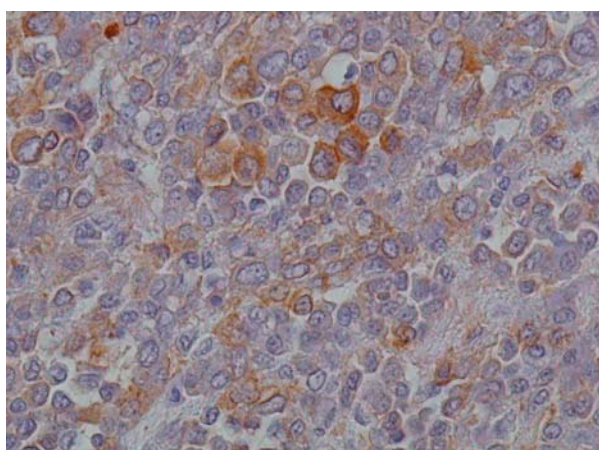


Figura 3: mastocitoma III grado (ingrandimento 10X)

Discussione

La sovraespressione della glicoproteina-P si associa alla resistenza a differenti classi di farmaci chemioterapici citotossici [1] e la velocità di efflusso del farmaco dalla cellula si correla ai

livelli di espressione della Pgp e all'affinità della stessa per il substrato [14].

In medicina veterinaria è stata indagata l'espressione della Pgp in un'ampia varietà di neoplasie epiteliali e mesenchimali in relazione all'impiego di differenti epitopi proteici impiegati come sistemi di identificazione immunoistochimica [6]. In particolare l'impiego del clone C494, quale anticorpo primario, che cross reagisce con il tessuto di cane ha determinato la messa appunto di una metodica attendibile e di agevole esecuzione al fine di ottenere informazioni valide in tempi contenuti e perciò proponibile come esame diagnostico di approfondimento all'istopatologia.

È stata dimostrata l'esistenza nel tumore mammario umano di un punto di cut-off, calcolato, come percentuale di cellule positive ad elevato ingrandimento, pari al 20%, 18,40% nel tumore mammario canino [8] discriminante gli individui in cui è maggiore la probabilità di sviluppare chemioresistenza dovuta alla sovraespressione della Pgp [15].

Lo studio dell'espressione della Pgp nel linfoma canino ha consentito di correlare i dati clinici e istopatologici con la possibilità di fornire informazioni prognostiche e di evidenziare aspetti di comparazione con la medicina umana, relativi al comportamento biologico della neoplasia simile al linfoma non-Hodgkin [7].

Nel mastocitoma lo studio dell'espressione della Pgp ha evidenziato una variabilità di espressione all'aumentare della malignità della neoplasia in accordo a quanto rilevato da analisi preliminari precedenti [13]. Esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione della Pgp ed il grado istologico. Tuttavia anche mastocitomi ben differenziati possono esprimere la Pgp in percentuale significativa. Studi ulteriori sulla correlazione tra l'espressione della Pgp e la risposta al protocollo chemioterapico potranno determinare l'efficacia di tale proteina come marker prognostico di MDR.

Conclusion

Nei casi esaminati nel presente studio, la positività all'immunoistochimica per la Pgp è funzione diretta del grado istologico del mastocitoma. La rilevanza delle informazioni ottenibili con l'indagine immunoistochimica per

la Pgp implica la possibilità, nell'eventuale conferma dei dati ottenuti con successivi studi di follow up relativi soprattutto alla risposta alla chemioterapia all'evoluzione della patologia e al tempo di sopravvivenza, di un impiego routinario della metodica di individuazione della proteina associata all'istopatologia diagnostica del mastocitoma cutaneo canino allo scopo di incrementare le indicazioni a carattere prognostico.

Bibliografia

1. Ambudkar SV, et al: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 361-398
2. Trock B, et al: Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance, *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (1997) 917-931
3. Ng I, et al: Expression of P-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 134 (1998) 70-78
4. Leith CP, et al.: Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 94 (1999) 1086-1099
5. Yuen A, et al: Multidrug resistance in lymphomas, *Clin. Oncol.* 12 (1994) 2453-2459
6. Ginn PE, Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet. Pathol.* 5 (1996) 533-541
7. Lee JJ, et al.: P-Glycoprotein Expression in Canine Lymphoma. A relevant, intermediate model of multidrug resistance, *Cancer* 77(1996) 1892-1898
8. Miyoshi M, et al.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 64 (2002) 531-533
9. Petterino C, et al.: Evaluation of a cut-off point of PGP expression in canine mammary gland tumours as a diagnostic tool. 21st meeting ESVP, Dublin (Eire) 2003. oral presentation
10. London CA, et al: Mast cell tumors in the dog. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*, 33 (2003) 473-483
11. Thamm DH, et al: Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor-41 cases (1992-1997). *J. Vet. Intern. Med.*, 13 (1999) 491-497
12. Meuten DJ: Tumors in domestic animals, 2002 fourth edition, Iowa State Press, Iowa
13. Hendrick MJ, et al: Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. 1998 vol II, Series ed. Washington DC
14. Dicato M, et al.: Multidrug resistance: molecular and clinical aspects, *Cytokines Cell Mol. Ther.* 3 (1997) 91- 99
15. Linn SC, et al.: Clinical and farmacologic study of multidrug resistance reversal with vinblastine and bepridil. *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 812-819
16. Schnaider J, et al.: P-glycoprotein expression in treated and untreated human breast Cancer. *Brit. J. Cancer.* 60 (1989), 815-818
17. Linn SC, et. al.: Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int. J. Cancer* 71 (1997) 787-795

UN CASO DI MALATTIA RENALE POLICISTICA FELINA CON INTERESSAMENTO CUTANEO

*Bongiovanni Laura, Romanucci Mariarita, Boari Andrea *, Della Salda Leonardo.*

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo;

*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

Riassunto

Un gatto femmina, a pelo lungo, di 14 anni, morto con segni clinici di insufficienza renale cronica, mostrava all'esame necroscopico lesioni riferibili ad una patologia policistica multisistemica, caratterizzata in particolar modo dalla presenza di cisti multiple, di differente diametro, contenenti liquido chiaro trasparente, a livello epatico, ed in entrambi i reni, sparse sia nella corticale che nella midollare. Lesioni cistiche sono state inoltre riscontrate a livello del tessuto sottocutaneo in corrispondenza del costato destro. L'esame istologico di tali lesioni ha permesso di definirne un'origine tubulare a livello renale e duttale in ambito epatico, essendo infatti costituite da una parete di cellule epiteliali, mentre a livello sottocutaneo risultavano delimitate da cellule appiattite, di aspetto simil-endoteliale, ma negative all'immunoistochimica per il Fattore VIII e le citocheratine (cloni AE1/AE3). Le lesioni cistiche erano accompagnate da aspetti di nefrite interstiziale ed epatite, unitamente ad alterazioni regressive di entrambi i parenchimi. L'esame istopatologico dei tessuti colpiti, con l'ausilio di colorazioni speciali, istochimiche ed immunoistochimiche, ha permesso così di confermare una diagnosi, se pur unicamente morfologica, di Malattia del Rene Policistico. La "feline Polycystic Kidney Disease" (PKD) presenta numerose somiglianze con la patologia umana ADPKD (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease), una tra le più comuni malattie genetiche dell'uomo, la cui patogenesi tuttavia rimane ancora non completamente chiarita. La presente segnalazione si caratterizza per il riscontro di cisti sottocutanee, per nostra conoscenza, mai riferite in bibliografia associate a tale patologia.

Parole chiave: Malattia del rene policistico, patologia autosomica dominante, cute, gatto.

Summary

A case of feline Polycystic Kidney Disease with cutaneous involvement. A case of a 14 year old, long haired female cat, died with chronic renal failure clinical symptoms, and that at necropsy showed typical polycystic disease lesions, is reported. The lesions were characterized by the presence of multiple cysts of varying diameter, containing clear, transparent liquid, in the liver and the cortex and medulla of both kidneys. Cystic lesions were also found in right chest subcutaneous tissue. Light microscopy showed that cysts in the kidneys and liver were of tubular and ductal origin respectively. In both cases, the cyst walls consisted of epithelial cells whilst the cyst walls of the subcutaneous cysts consisted of thin, negative for cytocheratins (clones AE1/AE3) immunohistochemistry, endothelial-like cells that were nevertheless negative for Factor VIII immunohistochemistry. The cystic lesions in the kidneys and liver were accompanied by interstitial nephritis and hepatitis together with regressive alterations of both parenchyma. The histopathological analysis of renal and hepatic lesions with histochemical and immunohistochemical staining, led to the morphological diagnosis of Polycystic Kidney Disease. Feline Polycystic Kidney Disease (PKD) closely resembles human Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), one of the most genetic disease of human beings. The pathogenesis of this human disease has yet to be completely clarified. This case is characterized by the presence of subcutaneous cysts which, to our knowledge, have never been reported in association with this pathology.

Key words: Polycystic Kidney Disease, dominant autosomal disease, skin, cat.

UN CASO DI ISTIOCITOMA FIBROSO MALIGNO IN UN CANE CON SINTOMI PREVALENTEMENTE NEUROLOGICI

Capucchio Maria Teresa, Lotti Donatella, Bacchetti Marco*, Catalano Deborah, Valenza Federico.*

Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino

*Libero professionista, Torino

Riassunto

L'istiocitoma fibroso maligno, tumore infrequente nel cane, può originare dalla cute, dalla milza o svilupparsi in forma multisistemica. Un cane Rottweiler femmina di 8 anni è stato riferito per una visita ambulatoriale per una zoppia anteriore destra insorta da circa una settimana, poi rivelatosi un deficit propriocettivo con appoggio del piede sul dorso, associata negli ultimi giorni a disoressia e vomito. All'esame obiettivo generale si riscontrava una massa dolente in regione retroperitoneale. La visita neurologica evidenziava atassia dei quattro arti con trascinarsi del piede anteriore sinistro, difficoltà a scendere le scale, occasionali perdite di equilibrio e maneggio destro. I riflessi dei nervi cranici, la reazione di minaccia ed i riflessi spinali erano nella norma, mentre le reazioni posturali riscontravano un deficit propriocettivo anteriore destro. L'ecografia addominale rivelava una massa utero-ovarica. La necropsia ha permesso di evidenziare la presenza di una neoformazione lardacea infiltrante (cm. 1.5) coinvolgente la corteccia cerebrale e la sostanza bianca subcorticale (lobi frontali e parieto-temporali) dell'emisfero sinistro. Neoformazioni simil neoplastiche erano presenti a livello polmonare e renale. Una voluminosa massa biancastra lardacea (cm. 6) bernoccoluta era visibile a livello uterino. Tra gli altri reperti venivano osservati endocardiosi atrio-ventricolare sinistra, gastrite ed enterite croniche diffuse e grave cistite cronica. Non sono state osservate neoformazioni cutanee. L'esame istologico ha permesso di classificare le neoformazioni encefalica, polmonare e renale come espressione di un unico processo neoplastico coinvolgente le cellule istiocitarie. In particolare le neoformazioni si presentavano diffusamente infiltranti con ampie aree necrotiche. Le cellule neoplastiche disposte per lo più a tappeto o talvolta in lamine separate da esili trabecole connettivali, erano pleomorfe,

voluminose con citoplasma eosinofilo, nucleo rotondeggiante o ovale, spesso multiplo, con nucleolo evidente e cromatina per lo più finemente dispersa. Erano inoltre osservabili disseminate cellule multinucleate, talora isolate talora riunite in piccoli gruppi, e moderati infiltrati infiammatori di cellule mononucleate. Le mitosi erano numerose. Indagini immunohistochimiche (citocheratine, lisozima, vimentina, desmina, actina, GFAP, Ki 67) hanno permesso di classificare la neoplasia come un istiocitoma fibroso maligno, variante a cellule giganti.

Parole chiave: cane, encefalo, neoplasia multicentrica, istiocitoma fibroso maligno, cellule giganti.

Summary

Malignant fibrous histiocytoma in a dog with neurological signs. One case of malignant fibrous histiocytoma was found in a female Rottweiler dog aged 8 years. The animal showed only neurological symptoms. Macroscopically a grayish tumor mass with indistinct margins involving frontal and parieto-temporal cortex was observed. Similar proliferations in the lung and in the kidneys were also present. Histological examination reveals the presence of a neoplastic proliferation with multifocal necrosis. The tumor cells arranged in sheets separated by moderate connective tissue were pleomorphic with abundant eosinophilic cytoplasm and round to ovoid nuclei. Multinucleate cells and non suppurative infiltration were also observed. Immunohistochemical stainings permit to classify the neoplasia as a malignant fibrous histiocytoma, giant cells type.

Key words: dog, brain, multiorgan neoplasia, malignant fibrous histiocytoma, giant cells.

UN INFREQUENTE CASO DI "SPINDLE CELL TUMOR" A LOCALIZZAZIONE SPLENICA PRIMARIA IN UN CANE. RILIEVI CITOLOGICI ED ISTOPATOLOGICI, OSSERVAZIONI ISTOCHEMICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE

Antuofermo Elisabetta, Pirino Salvatore, Rocca Stefano, Antonica Mura, Anfossi Antonio, Zucca Rosalba, Nieddu Antonio Mario*

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria – *Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Facoltà di Medicina – Università degli Studi di Sassari

Riassunto

Tutti i tumori fusocellulari derivano verosimilmente da una unica cellula staminale mesenchimale pluripotente. Macroscopicamente e microscopicamente i tumori delle cellule muscolari lisce e i tumori del tessuto connettivo fibroso, si presentano morfologicamente simili. Un tempo la diagnosi di fibrosarcoma veniva espressa più frequentemente; attualmente l'ausilio di tecniche sempre più sofisticate ci consente di differenziare con maggior precisione i differenti istotipi cellulari. Per tale motivo, abbiamo ritenuto interessante riferire su un cane meticcio, maschio, di quattro anni sottoposto ad eutanasia dopo aver mostrato letargia, anoressia e perdita di peso. Alla necropsia si osservava una voluminosa neof ormazione splenica di colore biancastro, dura e di consistenza fibrosa. Il fegato si presentava notevolmente aumentato di volume con numerose neof ormazioni di piccole e medie dimensioni. Diversi campioni appartenenti agli organi sopramenzionati, venivano sottoposti ad una prima osservazione citologica. Parte di questi, dopo fissazione in formalina venivano inclusi in paraffina. Sezioni di 3-5 μ erano sottoposte a colorazioni ordinarie e speciali (H. E., tricromica di Mallory Azan e Van Gieson). Si eseguivano prove immunoistochimiche utilizzando il seguente algoritmo anticorpale: anti pan-citocheratine, anti vimentina, anti fattore VIII, anti- α actina L, anti desmina, anti CD 15, anti S-100. Con il complesso delle tecniche diagnostiche utilizzate risultava possibile osservare l'aspetto citomorfologico il quadro istologico complessivo della neof ormazione, e definire infine la caratterizzazione dell'istotipo cellulare. La neoplasia, altamente infiltrante, era costituita da ampi fasci intrecciati di cellule allungate

fusiformi, fibroblastosimili, a moderato indice mitotico, disposte in maniera ordinata, a spina di pesce. Esse risultavano positive alla vimentina e alla α actina L e negative alla desmina. Dette caratteristiche ci consentivano di formulare diagnosi di fibrosarcoma, neoplasia a infrequente localizzazione splenica primaria, e di identificare come metastasi della stessa, le neof ormazioni riscontrate a livello epatico.

Parole Chiave: Tumore a Cellule Fusate, Milza, metastasi

Summary

A citologic, istopathologic, histochemical and immunoistochemical study on spindle cell tumor in a dog with primary localization in the spleen: an infrequent case. All the spindle cell tumors, derive from a unique pluripotent mesenchymal stem cell.

In this study we made a necropsia on a dog, male, four years old, that was submitted at eutanasia after a time of anorexia, lethargy and weight loss. At the gross morphology the dog presented, a voluminous white greenish, firm mass within the spleen and numerous multifocal mass of different size within the liver.

Numerous samples of spleen, liver and lymph node were employed for cytologic and histopathologic investigations.

Immunohistochemistry was performed, with antibody against pan-cytokeratin, vimentin, factor VIII, α actin-L, desmin, CD 15, S-100. Cytologic findings showed the typical aspect of sarcomatous cells. At the histopathological examination, the neoplasia appeared as an infiltrative tumor with interwoven/herringbone fascicular pattern. The histochemical reaction

showed positivity for collagen. The immunohistochemistry gave positive reaction to the anti-vimentin and the alfa actin antibody and no reaction for the anti-desmine antibody.

On these all findings, a final diagnosis of fibrosarcoma was achieved.

Key Words: Spindle Cell Tumor, Spleen, metastasis

Introduzione

Tutti i tumori fusocellulari derivano verosimilmente da una unica cellula staminale mesenchimale pluripotente. Appartengono alla categoria spindle cell tumors un gruppo eterogeneo di neoplasie, composte da cellule mesenchimali, capaci di produrre matrice collagena. Molte di queste, come lo schwannoma maligno, il leiomioma, l'istiocitoma fibroso maligno, il melanoma a cellule fusate e le corrispondenti forme non neoplastiche presentano caratteristiche istologiche simili ai tumori del tessuto connettivo fibroso. Per questa ragione in passato veniva emessa con frequenza la diagnosi di fibrosarcoma

Neoplasia relativamente comune nel gatto, infrequente nel cane, e nelle altre specie animali, il fibrosarcoma si sviluppa prevalentemente in soggetti adulti o anziani. L'età media dei soggetti colpiti è infatti di 12 anni nel gatto e 10 nel cane. In quest'ultima specie inoltre, la neoplasia sembra interessare maggiormente le femmine. Non sono segnalate predisposizioni di razza. Le sedi di più frequente localizzazione risultano nell'ordine: cute, sottocute, estremità degli arti, cavità orale e nasale. Rara è la localizzazione a carico degli organi interni.

Per quanto detto, abbiamo ritenuto interessante descrivere un caso di fibrosarcoma a localizzazione splenica primaria osservato in un cane di giovane età. Di tale neoplasia abbiamo preso in considerazione l'aspetto citomorfologico, il quadro istologico complessivo, e l'istotipo cellulare coinvolto.

Materiali e metodi

Namu, era un cane, meticcio maschio, di quattro anni di età, che veniva sottoposto ad laparotomia esplorativa, dopo aver mostrato per un lungo periodo di tempo letargia, anoressia e perdita di

peso. In conseguenza dell'evidenziazione di voluminose masse neoplastiche in cavità addominale, veniva soppresso mediante eutanasia e condotto presso l'Istituto di Patologia Generale ed Anatomia Patologica della Facoltà di Veterinaria di Sassari, per la necropsia. Diversi campioni appartenenti agli organi coinvolti dalla neoplasia, venivano sottoposti ad una prima osservazione citologica. Parte di questi, compresi i linfonodi portal, meseraici, pancreatici e mediastinici dopo fissazione in formalina venivano inclusi in paraffina. Sezioni di 3-5 µ venivano poi colorate con metodiche generali e speciali (H. E., tricromica di Mallory Azan. Policrom, e Van Gieson). Altri campioni erano sottoposti a processazione immunohistochimica, mediante la tecnica di immunoperossidasi. Gli anticorpi utilizzati, le loro diluizioni e gli eventuali metodi di smascheramento vengono riportati nella tabella 1.

Risultati

Alla necropsia si osservava la presenza di una neoformazione splenica, di circa 10x10 cm, singola, di colore grigio-biancastro, di consistenza duro-fibrosa e priva di capsula. Al taglio si presentava lobulata, opaca, con numerose aree emorragiche di colore rosso-scuro e aree bruno-giallastre di aspetto necrotico (Fig 1). A causa della presenza della massa neoplastica il parenchima splenico risultava nettamente atrofizzato. Il fegato appariva notevolmente aumentato di volume con numerose neoformazioni di dimensioni variabili da una nocciola fino ad un mandarino (Fig 2). Tali lesioni risultavano del tutto sovrapponibili per aspetto e consistenza a quelle della milza. I linfonodi portal, meseraici, pancreatici e mediastinici non mostravano variazioni di aspetto e di volume. All'esame citologico del tessuto splenico ed epatico si osservava la presenza di scarsi elementi stromali differenziati, per lo più singoli, raramente riuniti in piccoli gruppi di due o tre cellule al massimo. Queste, di forma prevalentemente fusata e di circa 12 micron di diametro, presentavano margini cellulari poco definiti, abbondante citoplasma basofilo, nuclei ovalari e allungati con uno o due nucleoli ben evidenti in posizione centrale (Fig 3). Nel complesso si rilevava moderata anisocitosi e anisocariosi. Raro era il

riscontro di mitosi. All'esame istologico la neoplasia, caratterizzata da elevata cellularità, appariva scarsamente demarcata e incapsulata e a crescita espansiva. Le cellule risultavano allungate, fusiformi, fibroblastosimili, altamente stipate tra loro, disposte in ampi fasci, intrecciati in maniera ordinata, frequentemente disposti a spina di pesce (Fig 4). I limiti cellulari erano mal definiti, il citoplasma eosinofilo e di aspetto fibrillare. I nuclei risultavano irregolari, di aspetto fusato o stellato, con uno o due nucleoli molto ben evidenti in posizione centrale. Nel complesso il pleomorfismo cellulare e nucleare risultava moderato e le mitosi non superavano le 2-3 per HPF. Si osservava inoltre nello spessore della massa la presenza di aree multifocali di necrosi emorragiche e di scarsi infiltrati linfoplasmacellulari.

Con l'ausilio di colorazioni speciali, quali la tricromica di Azan Mallory, la Policrom, e la Van Gieson, si evidenziava la presenza di proteine fibrose collagene.

Le prove immunoistochimiche attestavano una positività citoplasmatica diffusa ed intensa alla vimentina (Fig 5). In limitate aree della neoplasia era inoltre osservabile positività alla α actina-L. Detta positività appariva prevalentemente in corrispondenza delle trabecole spleniche o a carico di poche cellule sparse nel parenchima. Inoltre l'impiego dell'anticorpo Ki-67 svelava una

intensa attività preparatoria alle mitosi. L'insieme delle indagini espletate ha consentito di identificare la neoplasia come fibrosarcoma splenico primario con metastasi al fegato e senza coinvolgimento linfonodale

Considerazioni conclusive

Come risulta da precedenti lavori i fibrosarcomi splenici primari rappresentano il 12% dei sarcomi di origine non angiomatosa e non linfomatosa, e si manifestano in cani la cui età media è intorno ai dieci anni.

Il fibrosarcoma è un tumore che tende a recidivare dopo asportazione chirurgica, in misura proporzionale al grado di malignità. La possibilità di dare metastasi al contrario non è frequente, e le percentuali riportate in bibliografia variano dal 9% al 25%.

La più frequente via di metastatizzazione è senza dubbio quella ematica, ed il polmone risulta essere l'organo più colpito da metastasi a distanza.

È interessante rilevare che nell'uomo, come nel cane, il fibrosarcoma rappresenta il 12% dei tessuti molli, colpisce prevalentemente gli individui di sesso maschile tra i 30 e 55 anni, sebbene sia possibile osservarlo in bambini di età inferiore ad un anno (fibrosarcoma infantile). Le metastasi linfonodali risultano infine nello 0,8% dei casi.

Anticorpo	Specificità	Clone	Smascheramento	Fonte	Diluizione
PAN-CK	Proteine del citoscheletro	Monoclonale	pepsina	Sigma	1:300
VIMENTINA	endoteli, fibroblasti c. mesenchimali	Monoclonale		Sigma	1:200
α ACTINA-L	m liscio mioepitelio miofibroblasti	Monoclonale		Sigma	1:400
MIOSINA	actin binding protein	Monoclonale		Dako	1:100
DESMINA	muscolare liscio e striato	Monoclonale	proteasi	Dako	1:600
MYO-D1	muscolare striato	Monoclonale	citrato	Dako	1:50
MIOGENINA	muscolare striato	Monoclonale	citrato	Dako	1:50
S-100	snc, c. schwann, melanociti	Policlonale		Dako	1:3500
FAT VIII	endoteli	Policlonale	proteasi	Dako	1:600
CD 34	endoteli	Monoclonale		Dako	1:50
CD 35	dendritici cell sarcoma	Monoclonale	proteasi	Dako	1:20
CD 10	neoplasie stromali	Monoclonale	citrato	Dako	1:50
CD 99	mark. linforeticolare	Monoclonale		Dako	1:100
CD 21	c. dendritiche follicolari	Monoclonale	proteasi	Dako	1:60
CD 117	GIST	Monoclonale		Dako	1:50
MIB-1	Indice mitotico	Monoclonale	citrato	Dako	Prediluito

Tabella 1: Algoritmo anticorpale utilizzato e, rispettive diluizioni.



Figura 1: (Milza). Aree emorragiche di colore rosso-scuro e aree bruno-giallastre di aspetto necrotico.



Figura 2: (Fegato). Multifocali neoformazioni di dimensioni variabili.

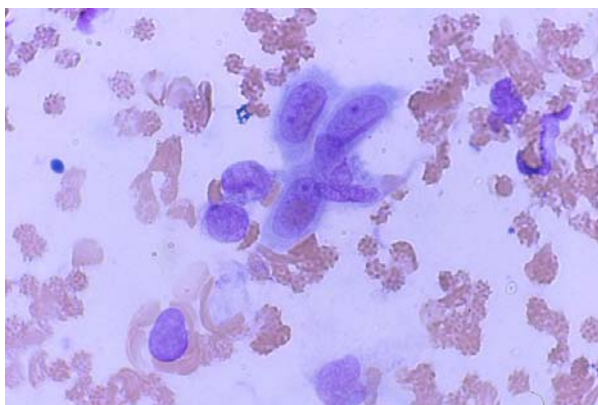


Figura 3: (Milza M.G.G.). Cellule fusate riunite in gruppo, nuclei grandi e ovalari, nucleoli evidenti.

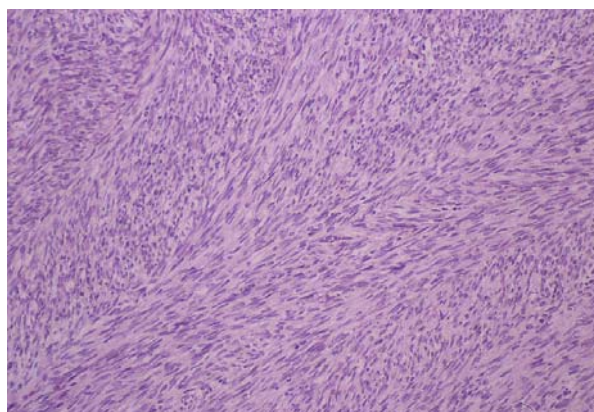


Figura 4: (Milza E.E). Fibroblasti disposti in ampi fasci a spina di pesce.

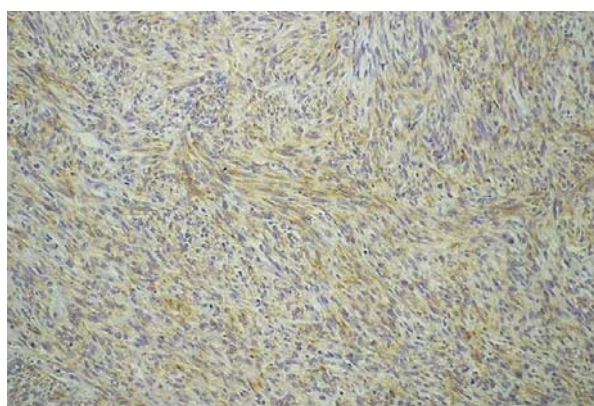


Figura 5: (Milza IHC). Diffusa positività alla vimentina.

Anche queste considerazioni rafforzano l'utilità di segnalare un caso di fibrosarcoma come quello da noi osservato. La diagnosi pienamente attendibile, è stata possibile grazie alle accurate osservazioni citologiche ed istologiche, ed ulteriormente confermata dagli accertamenti immunohistochimici. Infatti la chiara e diffusa positività alla vimentina confermerebbe quanto già ampiamente documentato da altri autori, circa l'origine fibroblastica della neoplasia, così come la focale positività alla alfa-actina potrebbe essere interpretata come una possibile differenziazione della linea mioide e/o miofibroblastica. La reazione negativa alla desmina, invece, al MYO-D1 e alla miogenina, escluderebbe l'origine miogena delle cellule proliferanti, indicando una possibile compartecipazione della linea miofibroblastica nello sviluppo della neoplasia. Infatti in base alle nostre esperienze non possiamo escludere che le cellule positive alla α actina-L

siano per l'appunto miofibroblasti. Resta comunque indubbio che nelle neoplasie del cane di origine sarcomatosa la distinzione tra fibroblasti, mioblasti e cellule staminali primitive è praticamente impossibile anche dopo studi di immunoistochimici ed ultrastrutturali; ognuna di queste cellule, infatti, può presentare una o più componenti di differenziazione mioide.

Bibliografia

1. Weinstein M.J., Carpenter J.L., Schunk C. J.M (1989). "Non angiogenic and non lymphomatous sarcomas of the canine spleen: 57cases (1975-1987). JAM Vet Med Ass, 195: 784-788
2. Oakes M.G., Lewis D.D., Hedlund C.S. e Hosgood G. (1993). Canine oral neoplasia Compendium on continuing Education for the Veterinarian 15: 15-30.
3. Slinger W.L., Culbertson M.R. e Kass P.H. (1994). "Primary Mesenchymal non angiomatous and non lymphomatous neoplasm in the canine spleen: anatomic classification, immunohistochemistry and mitotic activity correlated with patient survival". Vet Path 31-47
4. A.Poli., F. Abramo., S., Sozzi. I tumori dei tessuti molli negli animali domestici pg 40-42. Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche-Brescia luglio 1997.
5. Marcato P.S.(2002). Neoplasie della pelle. 1.28.6. Tumori del tessuto connettivo fibroso.
6. M.J. Hendrick., E.A. Mahaffey., F.M. Moore., J.H. Vos., E. J.Walder.Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissue of domestic animal. WHO second series volume 2
7. M.H Goldschmidt and M.J.Hendrick. Tumors of Skin and soft Tissues. Donald J. Meuten,Editor. Tumors in domestic Animals fourth edition.
8. Rosai and Ackerman's. Surgical Pathology ninth edition (2004). Soft Tissue volume 2

VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINA P53 IN CARCINOMI SQUAMOSI DEL LETTO UNGUEALE IN CANI DI RAZZA SCHNAUZER GIGANTE

Riccaboni Pietro

Dipartimento di Patologia animale Igiene e Sanità pubblica veterinaria – Sezione di Anatomia patologica veterinaria e Patologia aviaria – Università degli studi di Milano

Riassunto

p53 è un gene oncosoppressore il cui prodotto può inibire la crescita cellulare arrestandola nella fase G1 del ciclo cellulare. L'inattivazione della proteina p53 attraverso mutazioni o tramite l'interazione con oncoproteine virali o cellulari può indurre la trasformazione neoplastica; inoltre, questi meccanismi prolungano l'emivita della proteina facendola accumulare nel nucleo e permettendone l'individuazione

immunoistochimica, a differenza di quanto avviene alle concentrazioni presenti nelle cellule normali. Mutazioni e/o sovraespressioni della proteina p53 sono frequenti nelle neoplasie maligne umane, ma il ruolo di questa proteina nella carcinogenesi spontanea degli animali domestici è ancora poco conosciuto. Il carcinoma squamoso del letto ungueale è una patologia canina che interessa prevalentemente i soggetti a mantello scuro come schnauzer e labrador. Questa neoplasia, pur non presentando rilevanti differenze macro- microscopiche rispetto alle analoghe forme epidermiche, è caratterizzata da un comportamento biologico più aggressivo che si manifesta con una maggior propensione ad infiltrare i tessuti circostanti, sia molli sia scheletrici, e a metastatizzare ai linfonodi regionali. Per la presente comunicazione è stata studiata l'espressione della proteina p53 in 12 campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina, di carcinoma squamoso del letto ungueale di cani schnauzer gigante. A tal scopo è stato impiegato l'anticorpo monoclonale PAb240. Dei 12 casi in esame, solo 2 risultavano negativi, mentre negli altri 10 casi si rilevava la sovraespressione della p53. E' interessante notare come in questo particolare carcinoma squamoso, la proteina p53 risulti espressa più frequentemente che in analoghe forme di carcinoma squamoso localizzate in altre sedi. Benché questi risultati siano da considerarsi assolutamente preliminari, è

suggestivo pensare che p53 possa avere un ruolo importante nella carcinogenesi di questo tumore e che possa esistere una qualche correlazione fra la sovraespressione di questo marker ed il comportamento biologico della neoplasia studiata.

Parole chiave. p53, cane, schnauzer, carcinoma squamoso, letto ungueale.

Summary

Immunohistochemical evaluation of p53 protein expression in nailbed squamous cell carcinomas in Giant Schnauzer dog. p53 is a tumour suppressor gene and its product can arrest cell proliferation in late G1. Inactivation of the p53 protein by mutation or by its interaction with cellular or viral oncoproteins can lead to neoplastic cell transformation. Moreover, such mechanisms can prolong the half-life of the protein and cause immunohistochemically detectable overexpression of the p53 protein whereas its concentration in normal cells is so low that it cannot be detected. p53 mutations and/or overexpression are frequent in human malignancies but the role of the p53 protein in spontaneous carcinogenesis in domestic animals is still poorly understood. The nailbed squamous cell carcinoma is seen most commonly in black-coated dogs of large breed (Giant Schnauzer, Labrador). It is an aggressive tumour invading the adjacent soft tissue and the phalanx bone. The expression of p53 protein has been investigated in 12 (formalin fixed, paraffin embedded) squamous cell carcinomas of the nailbed of schnauzers, employing the monoclonal antibody PAb240. Positive samples were observed in 10 out of 12 cases. These preliminary results suggest that p53 may play an important role in the carcinogenetic process of this spontaneous tumour.

Key words: p53, dog, schnauzer, squamous cell carcinomas, nailbed.

**MESOTELIOMA PERITONEALE DECIDUOIDE
IN UN CANE: CARATTERIZZAZIONE ISTOCHEMICA, IMMUNOISTOCHEMICA
ED ULTRASTRUTTURALE**

Morini Maria, Bettini Giuliano, Morandi Federico, Burdisso Roberta, Marcato Paolo Stefano*

Servizio di Anatomia Patologica, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

*Libero Professionista, Bologna

Riassunto

Il mesotelioma deciduoide, descritto finora solamente nella patologia umana, rappresenta una rara variante istologica del mesotelioma epiteliale, il cui termine deciduoide deriva dalle strette analogie istomorfologiche esistenti tra le cellule neoplastiche e quelle della decidua.

Qui di seguito viene descritto un caso di mesotelioma peritoneale deciduoide in un cane femmina di 10 anni. Macroscopicamente si osserva una disseminazione in peritoneo ed in omento di numerose formazioni nodulari biancastre di piccole dimensioni (da 1 a 5 mm). Istologicamente il tessuto neoplastico è composto da voluminose cellule poligonali od ovoidali, con abbondante citoplasma intensamente eosinofilo, d'aspetto vitreo. Sono inoltre riportati i rilievi istochimici, immunoistochimici ed ultrastrutturali, che confermano definitivamente la natura mesoteliale del processo neoplastico.

Parole chiave: Mesotelioma deciduoide, decidua, cane, peritoneo.

Summary

Deciduid peritoneal mesothelioma in a dog: an histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study.

Deciduid mesothelioma is a rare variant of epithelial mesothelioma, only described in human pathology, that bears remarkable cytomorphological resemblance to decidua.

A case of malignant peritoneal mesothelioma with deciduid features in a ten-year-old female dog is described. At macroscopic examination a dissemination of small nodular whitish-grey masses (1-5 mm) was found in parietal peritoneum and omentum. Histopathology showed a neoplastic tissue composed of large polygonal or ovoid cells with an abundant eosinophilic glassy

cytoplasm. Histochemical, immunohistochemical and ultrastructural findings were also reported and the results confirmed the mesothelial origin of this tumour.

Key words: Deciduid mesothelioma, decidua, dog, peritoneum.

Introduzione

Il mesotelioma si manifesta, nel cane come nell'uomo, con tre principali varianti istologiche: epiteliale, fibrosa e mista. Nell'uomo inoltre è riportata anche la presenza di più rari sottotipi, tra i quali il deciduoide, il linfomatoide, il desmoplastico, il microcistico e lo scarsamente differenziato. Anche nel cane esistono alcune segnalazioni di mesoteliomi atipici, quali il cistico e lo sclerosante, a localizzazione esclusivamente peritoneale, mentre la forma deciduoide non è stata descritta.

Il caso oggetto di questa segnalazione riguarda un cane (meticcio femmina di 10 anni), con rilievi macroscopici e microscopici riferibili alla presenza di un mesotelioma deciduoide in cavità peritoneale.

Materiali e metodi

Da materiale campionato in sede ambulatoriale e pervenuto al nostro servizio diagnostico, proveniente da neoformazioni presenti in omento e peritoneo, sono stati allestiti preparati per l'istologia che, inclusi in paraffina, sezionati a 4 micron di spessore e colorati con ematossilina-eosina, sono stati osservati al microscopio. Su ulteriori sezioni dello stesso tessuto sono state effettuate colorazioni istochimiche (PAS ed Alcian Blu) ed immunoistochimiche (vedi tabella 1); porzioni tissutali sono state inoltre sottoposte ad osservazione ultrastrutturale.

Risultati

Un cane meticcio femmina di 10 anni era stato condotto a visita ambulatoriale per marcato abbattimento del sensorio e notevole aumento di volume dell'addome. L'esame clinico aveva fatto sospettare la presenza di liquido in cavità peritoneale, confermata poi dai rilievi ecografici, che avevano altresì svelato la presenza di una massa di 3.2 x 1.6 cm di diametro in omento craniale alla vescica ed un ispessimento del mesentere. Per volontà dei proprietari dell'animale non erano state effettuate ulteriori indagini in senso diagnostico e l'animale era stato soppresso. In sede ambulatoriale inoltre erano prelevate port-mortem piccole porzioni di tessuto del mesentere, fissate poi in formalina tamponata e successivamente pervenute al nostro servizio diagnostico.

Dal materiale fissato si osservavano numerose formazioni nodulari biancastre, di piccole dimensioni (da 1 a 5 mm di diametro), talora confluenti in lesioni di più grandi dimensioni, fittamente disseminate sul mesentere (figura 1). Il rilievo istologico corrispondente era costituito da una proliferazione solida e compatta di cellule simil-epiteliali, che solamente nei versanti superficiali tendeva a strutturarsi in nidi e proliferazioni tubulo-papillari. Erano inoltre presenti occasionali focolai di necrosi ed un infiltrato a piccoli focolai disseminati di cellule infiammatorie, in prevalenza mononucleati (piccoli linfociti e plasmacellule). A più forte ingrandimento le cellule neoplastiche apparivano di grandi dimensioni, di forma ovoidale o poligonale, con abbondante citoplasma intensamente eosinofilo, d'aspetto vitreo, e nuclei rotondeggianti, contenenti per la maggior parte uno o due singoli e ben evidenti nucleoli (figura 2). Talvolta all'interno del citoplasma era possibile osservare la presenza di singole vacuolizzazioni, a limiti netti, otticamente vuote, sulle quali non risultavano positive le colorazioni istochimiche effettuate (PAS ed Alcian Blu). Raro era il riscontro di figure mitotiche.

Il pannello immunostochimico utilizzato (tabella 1) permetteva di evidenziare nelle cellule tumorali una intensa espressione citoplasmatica di vimentina, citocheratine ad ampio spettro e della citocheratina 5/6 (figura 3), reperti considerati tipici e fortemente indicativi delle neoplasie di derivazione mesoteliale, mentre i restanti marcatori

non reagivano con le cellule neoplastiche. L'esame ultrastrutturale mostrava la presenza di cellule ovoidali o poligonali, unite da numerosi desmosomi, che presentavano sull'intera superficie cellulare lunghi e sottili microvilli ("mesothelial-type" o "non-intestinal type"). La maggior parte di queste cellule aveva inoltre il citoplasma occupato da grandi lumi intracitoplasmatici, delimitati da lunghi microvilli protrudenti all'interno (figura 4).



Figura 1: Aspetto macroscopico dell'omento, in cui sono chiaramente osservabili le numerose e disseminate formazioni nodulari.

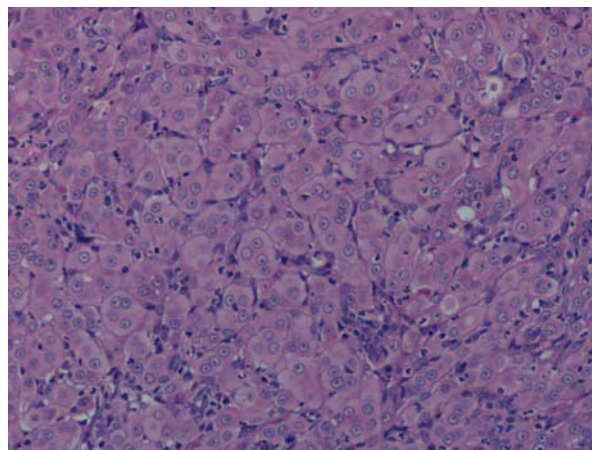


Figura 2: Cellule voluminose e rotondeggianti, a limiti ben definiti, con abbondante citoplasma debolmente eosinofilo, d'aspetto vitreo. E-E medio ingrandimento. Insetto: Occasionali voluminosi vacuoli intracitoplasmatici otticamente vuoti. E-E, forte ingrandimento.

Discussione e Conclusioni

Il mesotelioma deciduoide (anche detto mesotelioma con morfologia deciduoide) rappresenta una rara variante del mesotelioma

epiteliale, ed è così chiamato per la somiglianza istomorfologica delle cellule tumorali con le cellule della decidua, il rivestimento più superficiale dell'endometrio che, nelle fasi precoci

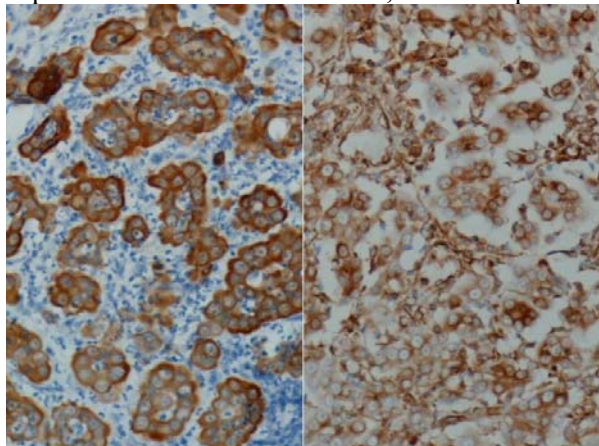


Figura 3: Marcata ed omogenea positività citoplasmatica sia per citocheratine ad ampio spettro (sx) sia per vimentina (dx), medio ingrandimento.

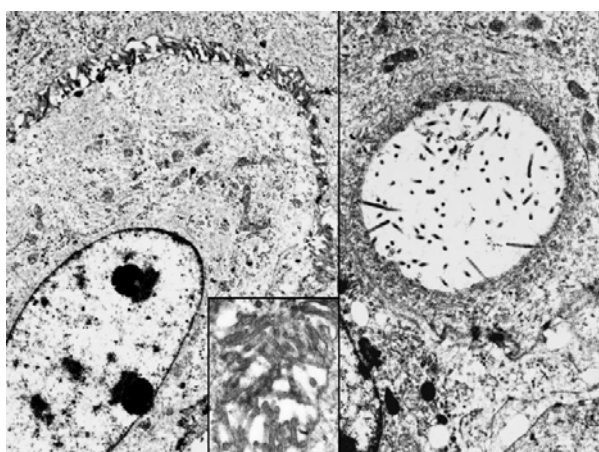


Figura 4: Numerosi, lunghi e sottili microvilli rivestono la superficie cellulare delle cellule neoplastiche (sx), 5400 T.E.M. Lume intracitoplasmatico bordato da microvilli con le stesse caratteristiche ("mesothelial-type") (dx), 6900 T.E.M.

Anticorpi	Ditta produttrice	Diluizione	Risultati
Citocheratine ad ampio spettro	Dako	1:1200	+++
Citocheratine 5/6	Dako	1:100	+++
Vimentina	Dako	1:100	+++
Actina del muscolo liscio	Dako	1:100	-
Desmina	Dako	1:50	-
CD117	Dako	1:400	-
S-100	Dako	1:800	-
Calretinina	Dako	1:200	-

Tabella 1: Anticorpi utilizzati e risultati ottenuti

della gravidanza, stabilisce rapporto con la blastocisti. Sembra colpire con maggiore frequenza le donne, si localizza preferenzialmente nel peritoneo e fino ad oggi se ne contano una trentina di casi nella letteratura mondiale. Istologicamente è composto da aree solide di cellule simil-epiteliale di grandi dimensioni, rotondeggianti o poligonali, con voluminoso citoplasma debolmente eosinofilo e caratteristicamente vitreo, che le rende anche simili ad epatociti o a cellule epatoidi.

Il caso capitato alla nostra osservazione presentava aspetti anatomo-istopatologici del tutto sovrapponibili a quelli del mesotelioma deciduoide descritto nella patologia umana. Soluzioni diagnostiche alternative considerabili nella diagnosi differenziale sulla base del solo quadro istologico (metastasi peritoneali di un carcinoma epatocellulare o di un carcinoma delle ghiandole epatoidi perianali) sono state escluse, oltre che per i riscontri anatomo-clinici, per i risultati dell'immunoistochimica e della microscopia elettronica, che hanno confermato l'origine mesoteliale della neoplasia.

Il caso qui descritto, oltre a rappresentare la prima segnalazione di mesotelioma deciduoide nel cane, sottolinea la necessità di affiancare nella diagnostica oncologica metodiche immunoistochimiche ed ultrastrutturali per perfezionare definitivamente la diagnosi.

Bibliografia

- Bettini G, Morini M, Marcato PS (2001): "Diffuse sclerosing peritoneal mesothelioma in three German shepherd dogs". Proceedings 19th Meeting ESVP, Thessaloniki, Greece, 25-28/9/01, pag. 204.
- DiPinto et al. (1995): "Cystic, peritoneal mesothelioma in a dog". *J Am An Hosp Ass* 31: 385-389.
- Geninet C et al. (2003): "Sclerosing peritoneal mesothelioma in a dog - A case report". *J Vet Med A* 50: 402-405.
- Nascimento AG, Keeney GL, Fletcher C (1994): "Deciduoid peritoneal mesothelioma". *Am J Surgical Pathol* 18: 439-445.
- Orosz Z et al. (1999): "Epithelial mesothelioma with deciduoid features". *Virchows Arch* 434: 263-266.
- Shanks JH et al. (2000): "Mesotheliomas with deciduoid morphology". *Am J Surgical Pathol* 24: 285-294.
- Shia J, Erlandson RA, Klimstra DS (2002): "Deciduoid mesothelioma: a report of 5 cases and literature review". *Ultrastruct Pathol* 26: 355-36.

CLASSIFICAZIONE ISTOPATOLOGICA DI 171 CASI DI LINFOMA NEL CANE E NEL GATTO SECONDO LA CLASSIFICAZIONE R.E.A.L.

Vezzali Enrico, Parodi André Laurent, Bettini Giuliano, Marcato Paolo Stefano*

Servizio di Anatomia Patologica, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna
*Département d'Anatomie Pathologique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort - Parigi

Riassunto

È stato eseguito uno studio retrospettivo su 123 casi di linfoma nel cane e 48 nel gatto per verificare la applicabilità della classificazione REAL recentemente proposta dall'OMS per i linfomi animali. I casi sono stati anche classificati secondo gli schemi della classificazione di Kiel e della National Cancer Institute Working Formulation; l'esame microscopico è stato affiancato dalla valutazione immunohistochimica del fenotipo B o T (CD79, CD3).

Si è registrata una prevalenza dei linfomi B nel cane (97/123; 79.9%) e dei linfomi T nel gatto (31/48; 64.6%). In particolare, nel cane gli istotipi più frequenti sono risultati, fra i linfomi B, quelli a grandi cellule (B-LCL: 56/97; 57.7%) ed i plasmocitici (PCT: 20/97; 20.6%); fra i linfomi a cellule T i linfoblastici (T-LBL: 8/26; 30.8%). Nel gatto, fra i linfomi a cellule T gli intestinali (ITCL: 16/31; 51.6%) ed i periferici (PTCL: 11/31; 35.5%); fra i linfomi B i B-LCL (8/17; 47.1%).

Le principali difficoltà rilevate nell'applicazione della classificazione REAL sono state relative alla presenza, fra i B-LCL, oltre ai linfomi simil-centroblastici (DLBCL) ed immunoblastici (LCIBL), peraltro spesso presenti in forme miste, di 13 casi (12 cani e 1 gatto) con una non codificata differenziazione plasmocitoide, ed al riscontro di tumori plasmocitici con coespressione di CD79 e CD3 (2 cani). Inoltre si è rilevata una certa difficoltà nella differenziazione fra i linfomi linfoblastici B (3 cani) ed i Burkitt (1 cane). Nell'ambito dei linfomi T si segnala il riscontro di una notevole variabilità morfologica nell'ambito della classe unica dei linfomi T intestinali (5 cani e 16 gatti) e, nel cane, di 4 casi di linfomi a piccole cellule T mature ad insorgenza multicentrica e di un caso di linfoma timico T, non codificabili nella REAL.

Parole chiave: Linfoma; cane; gatto, classificazione REAL

Summary

Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline lymphoma according to the R.E.A.L. classification. A retrospective study on 123 canine 48 feline lymphoma was carried in order to confirm the suitability of the REAL classification, recently proposed by the WHO for animal lymphomas. All cases were also classified according to the Kiel classification and the National Cancer Institute Working Formulation. Microscopic examination was performed after standard staining (HE) and immunohistochemical labelling for B (CD79) or T (CD3) cell phenotypes.

A high prevalence of B-lymphomas (BL) in dogs (97/123; 79.9%) and of T-lymphomas (TL) in cats (31/48; 64.6%) was observed. Particularly, in dogs the most frequent BL were B-Large Cell Lymphomas (B-LCL: 56/97; 57.7%) and Plasmacytic Tumors (PCT: 20/97; 20.6%). Among TL the T-Lymphoblastic type was the most frequent in dogs (T-LBL: 8/26; 30.8%) as Intestinal (ITCL: 16/31; 51.6%) and Peripheral (PTCL: 11/31; 35.5%) in cats; in the latter B-LCL (8/17; 47.1%) was the commonest among BL.

The main difficulties using the REAL classification have been the presence, among B-LCL, apart from the Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) type and the Large Cell Immunoblastic Lymphoma (LCIBL) type often present in mixed type, of 13 cases (12 dogs and 1 cat) with a plasmacytoid differentiation which is not considered as a distinct subtype. In addition, two cases of PCT in dogs expressed both CD79 and CD3 positivities. Furthermore, we met a certain difficulty in differentiating B-LBL (3 dogs) from Burkitt-type lymphoma. ITCL (5 dogs and 16 cats) exhibited a huge morphologic

variability. Finally, there were 4 cases of multicentric mature small cell TL and a thymic TL in dogs, which are not codified in the REAL classification.

Key words: Lymphoma; dog; cat; REAL classification

Introduzione

I carnivori domestici sono spesso colpiti da patologie linfomatose il cui studio può anche risultare utile per comprendere diversi aspetti del linfoma non-Hodgkin umano, col quale condividono indiscutibili somiglianze; è vero altresì che le conoscenze della medicina umana hanno spesso apportato preziose informazioni alla medicina veterinaria: le classificazioni del linfoma non-Hodgkin umano evolutesi negli anni sono state costantemente adattate alle neoplasie linfoidi animali. Inizialmente l'adozione della classificazione di Kiel, adattata dalla prima edizione (Lennert, 1978), ha posato concrete basi immunologiche che hanno permesso di considerare le cellule linfoidi coinvolte da trasformazioni tumorali come stadi più o meno immaturi appartenenti alla medesima linea evolutiva; in seguito, l'applicazione della Working Formulation (National Cancer Institute, 1982) ha schematizzato la classificazione dei linfomi, introducendo il concetto di neoplasie ad alto, medio e basso grado, valutando soprattutto la dimensione nucleare delle cellule e l'aspetto diffuso o follicolare che le stesse presentano all'interno del tessuto in esame; la classificazione di Kiel è stata poi aggiornata, discriminando fra neoplasie costituite da linfociti B e T. Nel 1994 è stata formulata la Revised European American Lymphoma (REAL) classification (Harris et al., 1994) che si può considerare un elenco di patologie con differente comportamento biologico e clinico, accomunate da un punto di vista patologico dalla proliferazione di cellule linfoidi, valutate morfologicamente e mediante immunofenotipizzazione; recentemente, questa classificazione è stata anche adattata ai linfomi animali sotto l'egida l'Organizzazione Mondiale della Sanità (Valli et al., 2002).

In questo studio retrospettivo la classificazione REAL è presa in esame, verificandone l'applicabilità su una casistica selezionata.

Materiali e metodi

A partire da più di 200 casi di linfoma in carnivori domestici, raccolti presso l'archivio del Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna sono stati selezionati 123 casi di linfoma nel cane e 48 nel gatto, sulla base della disponibilità di materiale dalla morfologia sufficientemente conservata e con espressione antigenica adeguata a reazioni immunoistochimiche. Tutti i casi sono stati valutati morfologicamente su sezioni colorate con ematossilina-eosina, e quando necessario si sono anche realizzate colorazioni istologiche speciali (blu di toluidina, verde di metil pironina, impregnazione argentea di Gomori e tricromica di Masson). Quando disponibili sono stati anche valutati strisci od impronte citologiche colorate con May-Grünwald Giemsa. Tutti i casi sono stati valutati immunoistochimicamente per l'espressione di CD79, marker linfocitario B, e CD3, marker linfocitario T.

Sui casi così selezionati è stata applicata la classificazione REAL proposta nel 2002 per i linfomi animali (Valli et al., 2002).

Risultati

L'età degli animali in esame varia da 2 a 13 anni nel cane e da 1 a 16 nel gatto. L'analisi della distribuzione di razza mostra una marcata prevalenza di cani meticci (29/124), seguiti da Pastori Tedeschi (26/124) ed una netta prevalenza di gatti europei. La distribuzione di genere nel cane mostra 66 maschi (M) o castrati (C), 51 femmine (F) o sterilizzate (S) e 6 ignoti; 31 M o C e 17 F o S nel gatto.

Si è registrata una prevalenza dei linfomi B nel cane (97/123; 79.9%) e dei linfomi T nel gatto (31/48; 64.6%). In particolare, nel cane gli istotipi più frequenti sono risultati, fra i linfomi a cellule B, quelli a grandi cellule (B-LCL: 56/97; 57.7%) ed i plasmocitici (PCT: 20/97; 20.6%); fra i linfomi a cellule T i linfoblastici (T-LBL: 8/26; 30.8%). Nel gatto, fra i linfomi a cellule T gli intestinali (ITCL: 16/31; 51.6%) ed i periferici (PTCL: 11/31; 35.5%); fra quelli a cellule B i B-LCL (8/17; 47.1%).

In tabella 1 sono raccolti i risultati della classificazione.

REAL classification		WF	Kiel (cell type)	N° cats	N° dogs	N° tot.		
B	precursor	B-ALL/B-LBL	ALL, LBL	Lb	1	3	5	
	mature	B-CLL/B-SLL	CLL, SLL	Lc	0	3	3	
		LLI			0	1	1	
		LPL	SLLP	Pl	0	4	4	
		MCL	DSCCL	Cc	0	2	2	
	follicular	FCCL-I	FSCCL	Cc	0	0	0	
		FCCL-II	FMCL	Cc-Cb	1	2	3	
		FCCL-III	FLCL	Cb	3	1	4	
		NMZ	CLL, FSCCL, DSCCL, DMCL	Lc, Cc, Cb	0	3	3	
		SMZ			0	0	0	
		MALT-L			1	1	2	
	plasmacytic tumors	PCT Indolent	Extramedullary plasmacytoma	Extramedullary plasmacytic lymphoma	1	19	20	
		PCT Anaplastic			1	1	2	
		Myeloma	Multiple myeloma	Multiple myeloma	1	0	1	
	B-LCL	DLBCL, DLBCCL	DMCL, DLCL, DLCCCL	Cc, Cb	5	41	46	
		LCIBL	LCIBL	Ib	3	13	16	
		T-cell rich B-LCL	DMCL, DLCL	Cb	0	1	1	
		Thymic B-LCL	DMCL, DLCL	Cb	0	1	1	
Burkitt-type, Burkitt-like		SNCCCL		0	1	1		
T	precursor	T-ALL/T-LBL	ALL, LBL	Lb	0	8	8	
	mature	T-CLL/T-SLL	CLL, SLL	Lc	0	4	4	
		LGL			1	0	1	
		NK-CCL			0	0	0	
		cutaneous	CEL	MF/SS o DLCL, DMCL, DSCCL	MF/SS	0	2	2
	CNEL		MF/SS-like o DLCL, DMCL, DSCCL	MF/SS-like	0	4	4	
	PTCL		DSCCL, DMCL, DLCL, DLCCCL		11	3	13	
	ATL	ACL	DSCCL, DMCL, DLCL, DLCCCL		3	0	2	
		AIL						
	ITCL			DSCCL, DMCL, DLCL, DLCCCL, LCIBL		16	5	21
	ALCL			LCIBL		0	0	0
				48	123	171		

Tabella 1. Risultati dell'applicazione della classificazione REAL su 171 casi di linfoma nel cane e nel gatto. B o T-ALL/B o T-LBL: B o T-Acute Lymphoblastic Leukemia/B o T -Lymphoblastic Lymphoma; B o T o NK-CLL/B o T-SLL: B o T o Natural Killer-Chronic Lymphocytic Leukemia/B o T-Small Lymphocytic Lymphoma; LLI: Lymphocytic Lymphoma Intermediate type; LPL: LymphoPlasmacytic Lymphoma; MCL: Mantle Cell Lymphoma; FCCL: Follicular Center Cell Lymphoma; NMZ: Nodal Marginal Zone lymphoma; SMZ: Splenic Marginal Zone lymphoma MALT-L: Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma; PCT: PlasmaCytic Tumor; B-LCL: B Large Cell Lymphoma; DLBCL e DLBCCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma e Diffuse Large B-Cell Cleaved Lymphoma; LCIBL: Large Cell Immunoblastic Lymphoma; CEL: Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma; LGL: Large Granular Lymphocytes lymphoma; CNEL: Cutaneous Non-Epitheliotropic Lymphoma; PTCL: Periferal T-Cell Lymphoma; ATL (ACL o AIL): AngioTropic Lymphoma (AngioCentric o AngioInvasive); ITCL: Intestinal T-Cell Lymphoma; ALCL: Anaplastic Large Cell Lymphoma.

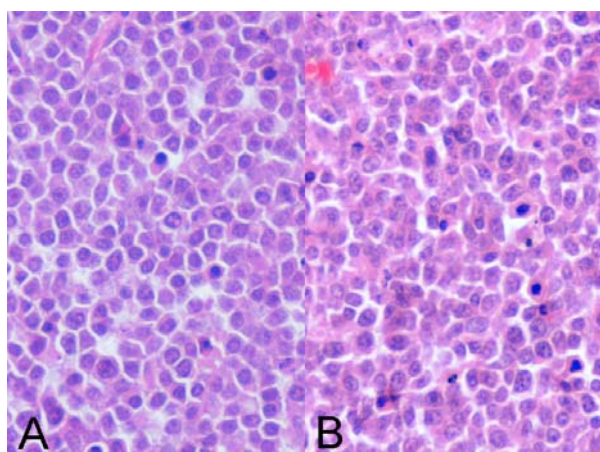


Figura 1. Cane, 40x, EE. Linfoma di tipo Burkitt (A) e linfoma linfoblastico B (B): morfologia cellulare, aspetto “a cielo stellato”, netti confini cellulari raffrontati e scarsi dettagli nucleari sono caratteristiche peculiari ma comuni ad entrambi i tipi, che risultano difficilmente differenziabili.

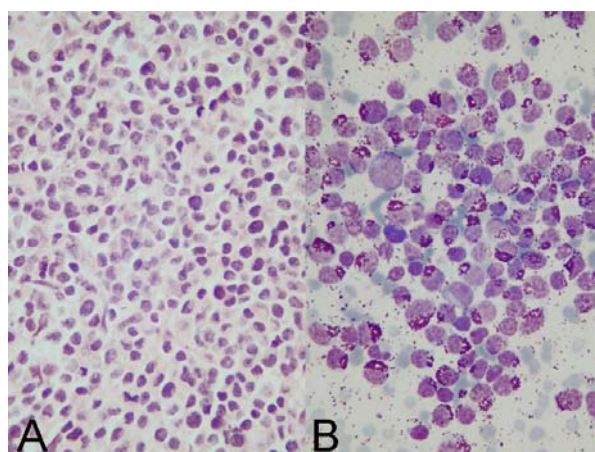


Figura 3. Gatto, 40x, A: EE; B: MGG. Linfoma LGL. L'aspetto istologico (A) non permette di valutare l'elemento diagnostico determinante costituito da granulazioni citoplasmatiche, evidenti su preparati citologici (B).

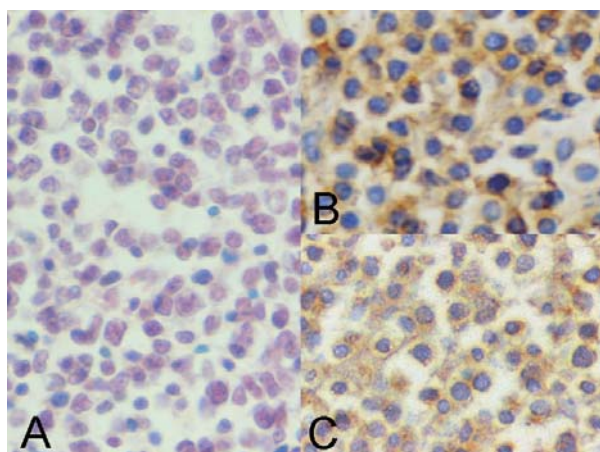


Figura 2. Cane, 40x, A: EE; B: CD3; C: CD79. Tumore plasmocitico indolente. La morfologia plasmocitoide (A) e la marcata positività citoplasmatica al CD79 (C) sono in netto contrasto con la positività al CD3 (B).

Discussione

Il presente studio ha evidenziato due principali debolezze dovute principalmente a lacune informative: l'assenza di notizie circa lo status FIV/FeLV dei gatti presi in esame e, più in generale, circa i valori ematologici della maggiore parte dei casi, precludendo la possibilità di svelare ogni condizione leucemica.

Dall'applicazione pratica della classificazione REAL sulla nostra casistica sono emersi diversi punti critici che hanno creato qualche difficoltà. I linfomi simil-centroblastici (DLBCL) ed immunoblastici (LCIBL) sono spesso presenti in forme miste e vengono accorpati all'interno della medesima categoria B-LCL (B-Large Cell Lymphoma); i linfomi T intestinali (ITCL) (5 cani e 16 gatti) presentano notevole variabilità morfologica; i linfomi linfoblastici B (B-LBL) (3 cani) e di tipo Burkitt (1 cane) presentano analogie tali per cui risulta difficile differenziarli (figura 1). Inoltre, i linfomi a grandi cellule B (B-

LCL) con differenziazione plasmocitoide (12 cani e 1 gatto), i linfomi ad insorgenza multicentrica (con certezza di non-leucemia) a piccole cellule T mature (4 cani), il linfoma timico T (1 cane) ed i tumori plasmocitici (PCT) CD3+ con coespressione di CD79 (2 cani) non sono bene codificati o talvolta nemmeno previsti dalla classificazione REAL (figura 2). Infine, se non si dispone di particolari marker immunoistochimici, il linfoma a grandi linfociti granulari (LGL) (1 gatto) risulta riconoscibile solo disponendo di preparati citologici che non ne alterino la struttura granulata (figura 3).

Conclusioni

La classificazione REAL è stata adattata dalla medicina umana a quella veterinaria e la maggior parte dei casi trova collocazione fra le categorie proposte, sebbene alcuni casi non possono essere fatti rientrare in nessuna classe ed alcune categorie della stessa classificazione umana non sembrano essere rappresentate in medicina veterinaria. Inoltre, il rilievo di peculiarità caratterizzanti i linfomi canini e felini, alla stregua delle diversità che hanno motivato la realizzazione di una classificazione animale differente da quella umana, potrebbe giustificare una suddivisione di specie negli aggiornamenti

della classificazione REAL. Infine, ci si auspica che dalla cooperazione fra patologi e clinici possano in un breve futuro emergere informazioni sull'effettiva rilevanza clinica di una classificazione così articolata, quali differenze di comportamento biologico o di sensibilità alla chemioterapia fra le diverse classi.

Bibliografia

1. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peters C, Falini B, Gatter KC: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84 (5): 1361-1392.
2. Lennert K: Malignant Lymphomas – other than Hodgkin's Disease. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 1978.
3. National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a Working Formulation for clinical usage. The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. *Cancer* 1982; 49: 2212-2135.
4. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF: Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 2002.

**LINFOMA PRIMARIO CONGIUNTIVALE DELLA PALPEBRA SUPERIORE
IN UN CANE**

Vascellari Marta¹, Mutinelli Franco¹, Multari Domenico²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padova, Italia

²Domenico Multari, DVM, Ambulatorio Veterinario, via Donatori del sangue 1, 31020 Fontane di Villorba, Treviso, Italy

Riassunto

Nella presente nota viene riportato un caso di linfoma congiuntivale in un cane Siberian husky di quattro anni, sottoposto a visita clinica in seguito all'insorgenza di una voluminosa neof ormazione originante dalla superficie bulbare della palpebra superiore dell'occhio destro. Alla visita oftalmologica, il soggetto presentava irritazione della mucosa congiuntivale, blefarospasmo ed epifora. La massa (1,5x3 cm) si estendeva dalla congiuntiva della palpebra superiore fino al margine craniale della terza palpebra. Dopo un trattamento antinfiammatorio locale, si è proceduto all'asportazione chirurgica della neof ormazione. Istologicamente la massa era costituita da voluminose cellule poligonali con aumentato rapporto nucleo/citoplasma, moderata quantità di citoplasma eosinofilo, nuclei pleomorfi, con cromatina vescicolare e nucleoli prominenti. Erano presenti numerose figure mitotiche. Mediante metodica immunoistochimica è stata valutata l'espressione degli antigeni CD3 e CD79 α da parte delle cellule neoplastiche. Circa il 70% delle cellule neoplastiche ha mostrato una positività di membrana nei confronti dell'antigene CD3, mentre tutte le cellule sono risultate negative all'antigene CD79 α . Sulla base dei reperti istologici e immunoistochimici è stata emessa diagnosi di linfoma a cellule T. L'area di resezione chirurgica ha rimarginato in poche settimane, guarendo completamente. Dopo 12 mesi il soggetto non presenta alcun segno di recidiva.

Il coinvolgimento oculare in corso di linfoma multicentrico è un evento comune nel cane, mentre la sede oculare in corso di linfoma extranodale è rara. Tuttavia, quello descritto è il primo caso di linfoma congiuntivale segnalato nel cane.

Parole chiave: cane, congiuntiva, linfoma, palpebra superiore, chirurgia.

Summary

Primary lymphoma of the upper eyelid conjunctiva in a dog. A case of conjunctival lymphoma in a 4-year-old Siberian husky is reported. A large red mass protruding from the bulbar surface of the upper eyelid of the right eye was present. Irritation, blepharospasm and epiphora were revealed on initial ophthalmic examination. The mass (1.5x3 cm) extended from the conjunctiva of the upper eyelid to the anterior surface of the third eyelid. After anti-inflammatory treatment, surgery was performed and the mass completely removed. Histologically, the mass consisted of large polygonal cells with high nucleus to cytoplasm ratio, moderate amounts of slightly eosinophilic cytoplasm, pleomorphic nuclei with vesicular chromatin and prominent multiple nucleoli. Mitotic figures were frequent. Approximately 70% of the neoplastic cells were CD3 positive and CD79 α negative. The surgical area healed uneventfully and after twelve months the dog exhibited no recurrence.

Ocular involvement in cases of multicentric lymphoma is common in dogs, while ocular extranodal presentation of lymphoma is rare but has been previously documented in dog. Nevertheless, this is the first report of primary conjunctival lymphoma in a dog.

Key Words: dog, conjunctiva, lymphoma, upper eyelid, surgery.

***FOSFOLIPIDOSI IN PATOLOGIA TOSSICOLOGICA.
ESEMPI DI FOSFOLIPIDOSI ASSOCIATA ALLA SOMMINISTRAZIONE DI UN
NUOVO COMPOSTO IN DUE SPECIE***

Lanzoni Anna, Piaia Alessandro, Cristofori Patrizia

Pathology Department, Safety Assessment, GlaxoSmithKline, Via Fleming, 4, Verona Italy

Riassunto

Fosfolipidosi e' un termine utilizzato per indicare un accumulo generalizzato di inclusioni citoplasmatiche lisosomiali, caratterizzate da una matrice ultrastrutturale lamellare o cristalloide. Tali inclusioni si osservano in molti tessuti normali, ma possono accumularsi in seguito alla somministrazione di diversi composti. In particolare, accumuli generalizzati di tali inclusioni si osservano in animali da laboratorio dopo la somministrazione ripetuta di composti appartenenti a categorie terapeutiche diverse ma accomunati dalla peculiare struttura chimico-fisica che le rende anfifiliche, in grado cioe' di legarsi con lipidi polari tramite forze elettrostatiche e idrofobiche. Questo porta alla formazione di complessi composto-lipidi endogeni scarsamente degradabili dagli enzimi lisosomiali che si accumulano quindi intracellularmente. In questo lavoro vengono presentati esempi di quadri microscopici di fosfolipidosi in molteplici organi e tessuti di due specie (ratto e cane) trattate con un composto cationico anfifilico in studi preclinici.

Parole chiave: fosfolipidosi, CAD, ratto, cane, istopatologia.

Summary

Phospholipidosis in toxicologic pathology. An example of drug-induced phospholipidosis in two species.

Phospholipidosis is a term coined to describe a generalised accumulation of lysosomal cytoplasmic inclusions characterised by a lamellar or crystalloid ultrastructural matrix. These inclusions are commonly observed in many normal cell types, but can accumulate after the administration of many compounds. In particular, generalised accumulation of phospholipidic inclusions can be observed in laboratory animals after the repeated administration of many compounds from many therapeutic categories, sharing a peculiar physical-chemical structure (amphiphilia), that leads them to bind to polar lipids by electrostatic and hydrophobic forces. This is associated with the formation of drug-lipid complexes, which accumulate in the cell cytoplasm. In this work examples of microscopic features of phospholipidosis in many tissues from two species treated with a cationic amphiphilic compound in preclinical studies are presented.

Keywords: phospholipidosis, CAD, rat, dog, histopathology.

**LA MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM): IL METODO
ELETTIVO PER LA DIAGNOSI DI FOSFOLIPIDOSI**

Faustinelli Ivo, Paschetto Silvia, Suozzi Anna, Lanzoni Anna

Pathology Department - Safety Assessment
GlaxoSmithKline Medicine Research Centre, via Fleming 4, Verona, Italia

Riassunto

Il termine fosfolipidosi descrive una condizione associata ad un eccessivo accumulo di fosfolipidi nel citoplasma cellulare, causato da un alterato catabolismo lisosomiale dei fosfolipidi stessi. Molti composti, in particolare composti cationici anfifilici (CADs), hanno la propensione a causare fosfolipidosi come un non desiderato, ma abbastanza frequente, effetto collaterale osservato in studi di tossicologia. L'esame istologico di routine su sezioni di tessuto può far sospettare al patologo un quadro di fosfolipidosi quando particolari alterazioni istopatologiche, quali aspecifiche vacuolizzazioni lipidiche o modificazioni schiumose del citoplasma di macrofagi o di altre cellule, sono evidenziabili. Questa condizione si conferma mediante la microscopia elettronica a trasmissione che è in grado di rilevare organelli subcellulari contenenti strutture lamellari multicentriche chiamati figure mieliniche o corpi mielinici tipici del quadro e non osservabili alla microscopia ottica. La microscopia elettronica a trasmissione è quindi considerata come la tecnica elettiva per confermare modificazioni legate ad accumulo di fosfolipidi nel citoplasma cellulare. In questo lavoro, una valutazione ultrastrutturale è stata eseguita su campioni di fegato e polmone, due dei più caratteristici organi bersaglio della fosfolipidosi, provenienti da ratti trattati con CADs durante studi preclinici. Corpi mielinici sono stati osservati nelle cellule dell'epitelio dei dotti biliari epatici ed in macrofagi schiumosi presenti negli alveoli polmonari. Questo ha confermato la presenza di un accumulo di fosfolipidi sospettata durante la valutazione al microscopio ottico.

Parole chiave: microscopia elettronica a trasmissione, fosfolipidosi, ratto.

Summary

Transmission Electron Microscopy (TEM): the gold standard in phospholipidosis diagnosis. The term phospholipidosis described a condition of excessive accumulation of phospholipids in the cytoplasm of cells, caused by the impairment of lysosomal phospholipids catabolism. Many compounds, in particular those categorised as cationic amphiphilic drugs (CADs), have the propensity to cause phospholipidosis as an unwanted, but pretty frequent, side effect observed in toxicological study. Light microscopical examination of routine sections of tissue affected by phospholipidosis can alert the pathologist to the condition by the display of particular features, such as aspecific lipid vacuolation or foamy cytoplasmic changes in macrophages or other cells. This disorder is confirm by electron microscopic examination revealing subcellular organelles containing unicentric lamellar layers called myeloid figures or myeloid bodies not observable with the light microscope. Electron microscopical examination is therefore considering the gold standard to confirming the change associated with phospholipids accumulation in the cell cytoplasm. In the present work transmission electron microscopy examination had been performed in the liver and in the lungs, two of the most elective tissue in the phospholipidosis, taken from rats treated with CADs in preclinical studies. Cytoplasmic lysosomal lamellar bodies were observed in the liver biliary duct epithelium and in the alveolar lungs foamy macrophages. This confirmed the phospholipid accumulation suspected during the light microscopy examination.

Keywords: transmission electron microscopy, phospholipidosis, rat.

**VALORE DELL'ESAME DEI LEUCOCITI PERIFERICI NELLA FOSFOLIPIDOSI
INDOTTA DA FARMACI**

Suozi Anna, Lanzoni Anna, Faustinelli Ivo, Paschetto Silvia, Cristofori Patrizia

Safety Assessment Dept., Histopathology Unit, GlaxoSmithKline, Verona, Italy

Riassunto

La fosfolipidosi rappresenta un effetto indesiderato indotto da molti composti, in particolare da composti cationici anfifilici (CADs). L'induzione di fosfolipidosi nell'animale da parte di un nuovo composto generalmente non ne preclude l'ulteriore sviluppo per l'uso umano, ma è auspicabile la presenza di un metodo non-invasivo per rilevare e monitorare la fosfolipidosi che sia applicabile sia negli studi preclinici che in quelli clinici.

La fosfolipidosi, che induce un accumulo intracellulare eccessivo di fosfolipidi sotto forma di corpi lamellari lisosomiali (LLBs) negli organi bersaglio, è quasi costantemente accompagnata dalla presenza di LLBs nei linfociti periferici.

Nella nostra esperienza, l'osservazione al microscopio ottico di vacuolizzazioni citoplasmatiche dei leucociti negli strisci di sangue è suggestiva di fosfolipidosi, ma la diagnosi di conferma deriva dalla conta dei leucociti contenenti LLBs nel *buffy coat* (lo strato di leucociti concentrati tramite centrifugazione) tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

L'incidenza del 5% di leucociti contenenti LLBs è considerata il limite nella diagnosi di fosfolipidosi sia nell'animale che nell'uomo, ma il confronto con l'incidenza negli animali di controllo o nei campioni basali per l'uomo è essenziale per formulare la diagnosi definitiva essendoci un'occasionale presenza di piccoli LLBs anche in cellule normali.

In conclusione, noi consideriamo l'esame ultrastrutturale dei leucociti periferici un utile mezzo non-invasivo per monitorare la fosfolipidosi sia nell'animale da laboratorio che nell'uomo.

Parole chiave: fosfolipidosi, leucociti periferici, microscopia elettronica a trasmissione, corpi lamellari lisosomiali, uomo.

Summary

The value of peripheral leukocytes evaluation in drug-induced phospholipidosis

Phospholipidosis represents a side effect caused by many compound, in particular by cationic amphiphilic drugs (CADs). The fact that phospholipidosis may occur with a new compound in animals does not generally preclude its further development for use in humans but a non-invasive method for detecting and monitoring phospholipidosis, common to pre-clinical safety studies and clinical studies, would be desirable.

Phospholipidosis, resulting in an excessive intracellular accumulation of phospholipids in the form of characteristic lysosomal lamellar bodies (LLBs) in target organs, is almost invariably accompanied by the presence of LLBs in peripheral leukocytes.

In our experience, the observation of cytoplasmic vacuolation of leukocytes in blood smears with light microscopy is suggestive of phospholipidosis, but the confirmatory diagnosis arises from the count of LLBs containing leukocytes in buffy coat (the concentrated layer of leukocytes following centrifugation) by transmission electron microscopy (TEM).

The incidence of 5% of LLD containing leukocytes is considered the cut off in the diagnosis of phospholipidosis both in animals and in human, but for the conclusive diagnosis, it is always essential the comparison of the incidence with controls animals or the basal samples in human, due to the occasional background occurrence of small LLBs in many normal cells.

In conclusion, we consider the TEM examination of peripheral leukocytes a useful a non-invasive tool in monitoring phospholipidosis both in animals and in human.

Keywords: phospholipidosis, peripheral leukocytes, transmission electron microscopy, lysosomal lamellar bodies, human.

PROCESSAZIONE ISTOLOGICA “IN TOTO” DI TOPI NEONATI

Belluco Sara, Grieco Valeria, Rondena Marco, Scanziani Eugenio

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviaria - Facoltà di Medicina Veterinaria – Milano

Riassunto

Animali neonati sono occasionalmente oggetto di studio. Questo tipo di campione è particolarmente difficile da processare secondo le normali tecniche istologiche di routine. Scopo del lavoro è stato quello di approntare una metodica di processazione istologica su topi neonati. Sono stati esaminati tre gruppi costituiti da 8 animali ciascuno, soppressi nelle prime 24 ore di vita. Nel gruppo A si è proceduto alla raccolta dei principali organi che sono stati processati secondo le normali tecniche di routine. Il prelievo degli organi è risultato difficile a seguito dell'estrema fragilità dei tessuti. Inoltre non è stato possibile orientare i campioni durante l'inclusione in paraffina, cosicché sulle sezioni ottenute spesso impossibile la valutazione istologica di molti organi. Sugli animali del gruppo B è stato effettuato un taglio di 0.5 cm in corrispondenza della linea alba. I neonati sono stati fissati, decalcificati in soluzione di EDTA e processati secondo le normali tecniche di routine. Con questa metodica si sono verificati gravi problemi al taglio, probabilmente per una scarsa penetrazione della paraffina nei tessuti. Sugli animali del gruppo C è stato effettuato un taglio di 0.5 cm in corrispondenza della linea alba. Per divaricare l'incisione è stata applicata una bendarella di spugna. Ogni soggetto è stato fissato in formalina e sezionato trasversalmente ogni tre millimetri circa, ottenendo 6 parti. Ogni parte è stata posta in soluzione di decalcificazione (EDTA) e successivamente processata separatamente. Di ogni parte sono state effettuate sezioni seriali di 3 micron a 500 micron di distanza, colorate successivamente con EE. Il risultato ottenuto è stato ottimale, in quanto il processo di disidratazione e penetrazione della paraffina nei tessuti non ha mostrato problemi. Le sezioni sono risultate di ottima qualità istologica, permettendo sia uno studio morfologico di tutti gli organi dell'animale, sia una valutazione dei rapporti spaziali fra gli organi. E' stata esclusa

dallo studio la scatola cranica e il SNC, in quanto presenta delle difficoltà maggiori per la processazione. Il trimming di neonati secondo sezioni trasversali di 0.2-0.3 mm ciascuna si è rivelato un'ottima metodica sia in corso di valutazioni morfologiche che topografiche dei singoli organi ed è applicabile per qualsiasi studio d'organo, escluso il SNC, per il quale sono in corso ulteriori indagini.

Parole chiave: Trimming, neonati, topo

Summary

“In toto” histological trimming of neonatal mice Neonates are histologically evaluated in numerous circumstances, but technical procedures are not easily applicable. Our purpose was to establish a standardized trimming procedure to obtain good morphological slides in neonatal studies. We tested three groups of 8 mice each, sacrificed in the first 24 hours of life. In the group A mice were necropsied and single organs were trimmed. This method revealed problems in taking organs and in histological evaluation because samples got easily fragmentation. Mice of group B were decalcified and trimmed entirely, but slide-cut was impossible because paraffin didn't embed the samples. In the group C we cut mice-body in 6 parts, each of them was decalcified and trimmed separately. Slides were of a good morphological quality and, moreover, permitted topographical studies of organs. This method can be used for all kind of organs, except the SNC.

Key words: Trimming, neonates, mouse

Introduzione

Topi neonati sono occasionalmente oggetto di studio, sia in esperimenti di fenotipizzazione di nuovi ceppi transgenici, sia in test di tossicologia, sia in corso di malattie spontanee perinatali. Questo tipo di campione è particolarmente

difficile da processare a causa delle dimensioni ridotte e dell'estrema fragilità dei tessuti. In letteratura è possibile ritrovare una metodica consistente in sezioni longitudinali del soggetto previa fissazione in Bouin (Brighton, 2001), ma nei nostri laboratori la replicazione di questa tecnica ha portato a scarsi risultati dovuti alla perdita delle connessioni anatomiche degli organi. Scopo del lavoro è stato quello di definire una tecnica istopatologica che garantisse una buona fissazione del campione, una semplicità nella metodica e una adeguata qualità morfologica alla valutazione istologica.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati tre gruppi (A-B-C) costituiti da 8 animali ciascuno, soppressi nelle prime 24 ore di vita.

Nel gruppo A si è proceduto all'esame necroscopico sotto stereomicroscopio degli animali. Sono stati prelevati gli organi principali, fissati in sol 4% di formalina per 72 ore e processati secondo le normali tecniche di routine.

Nel gruppo B gli animali sono stati fissati in toto in sol 4% di formalina per 48 ore, previa incisione di 0.5 cm sulla linea alba, mantenuta aperta tramite l'ausilio di una spugna imbevuta di formalina. I campioni sono stati successivamente posti in una sol. EDTA al 10% per circa una settimana, quindi disidratati ed inclusi in paraffina in modo da ottenere, al taglio, sezioni trasversali dei soggetti.

Nel gruppo C gli animali sono stati fissati secondo il protocollo del gruppo B. Prima della decalcificazione i campioni sono stati sezionati trasversalmente ogni tre millimetri circa, ottenendo 6 parti (Fig. 1), che sono state poste in una sol. EDTA al 10% per circa una settimana e successivamente processate separatamente per l'inclusione in paraffina. Di ogni parte sono state effettuate sezioni seriali di 3 micron a 500 micron di distanza, colorate successivamente con EE (Fig. 2-3-4).

Per ogni gruppo sono state valutate la praticità della processazione (intesa come semplicità della tecnica e tempi) e la qualità morfologica delle sezioni ottenute.

Risultati

Gruppo A: si sono riscontrate notevoli difficoltà nell'individuazione e nel prelievo degli organi. Molti tessuti si sono frammentati durante questa operazione così che non è stata possibile una corretta orientazione in corso di inclusione in paraffina. Istologicamente le sezioni, seppur di buona qualità, sono state difficilmente valutabili causa la frammentazione degli organi e il loro malposizionamento.

Gruppo B: la tecnica di processazione si è rivelata molto semplice ed efficace. In corso di taglio è stato impossibile ottenere una sezione del campione in quanto questo si frammentava contro la lama del microtomo.

Gruppo C: la processazione è risultata semplice. Le sezioni sono risultate di ottima qualità con possibilità di una valutazione topografica degli organi (Fig. 2-3-4). Si sono riscontrati problemi con la parte A del campione, consistente nel cranio. Infatti a contatto con la lama del microtomo il campione si polverizzava.

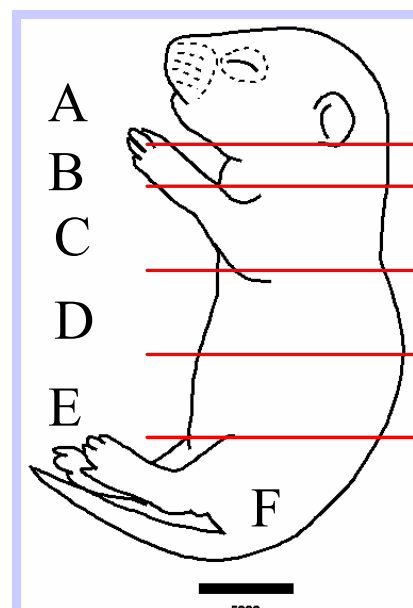


Figura 1: A-B: articolazione atlanto-occipitale; B-C: superficie craniale dell'articolazione scapolo-omerale; C-D: sup. caudale dell'articolazione omero-radio-ulnare; D-E: metà addome; E-F: articolazione coxo-femorale.

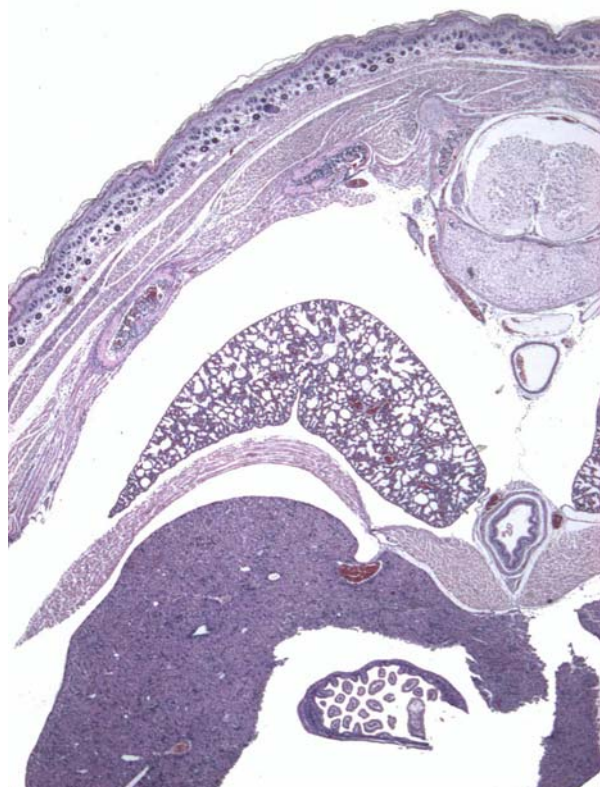


Figura 2: Gruppo C. Sezione della parte D. Cavità toracica e addominale.

Discussione

I topi appena nati sono oggetto di studio, sebbene non con la stessa frequenza di animali adulti o di embrioni. La mancanza di dettagli tecnici in letteratura (Brighton, 2001) ha reso a noi difficile la replicazione della metodica accennata. Abbiamo infatti provato a sezionare gli animali longitudinalmente, ma gli organi perdevano le connessioni anatomiche, rendendo difficile la processazione. Abbiamo così condotto un breve studio al fine di individuare una tecnica relativamente semplice che garantisse sezioni di buona qualità istologica.

Nel gruppo A abbiamo applicato la tecnica routinaria applicata negli animali adulti, consistente in un esame necroscopico e nel prelievo degli organi in sede autoptica. Gli scarsi risultati ottenuti nel gruppo A sono probabilmente da riferire alle dimensioni e alla fragilità del campione che rendono necessaria una notevole abilità tecnica.

Nel gruppo B gli animali sono stati fissati in toto. Probabilmente la cute ha costituito una barriera

alla penetrazione della paraffina così che al taglio il campione si è frammentato.



Figura 3: Gruppo C: Sezione della parte E. Panoramica addominale.

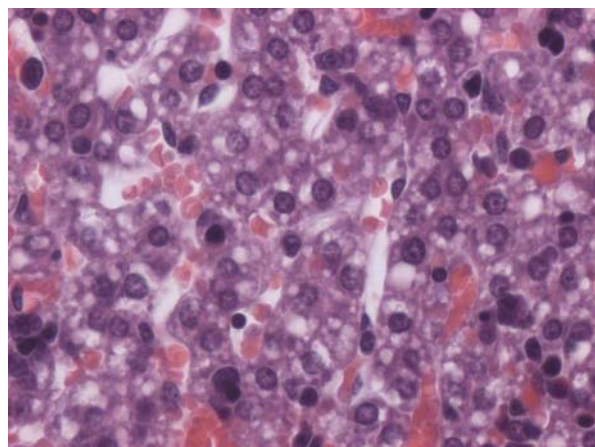


Figura 4: Gruppo C. Particolare del tessuto epatico neonatale.

I migliori risultati sono stati ottenuti con il protocollo applicato nel gruppo C. La processazione richiede un passaggio aggiuntivo rispetto al protocollo del gruppo B, consistente nel sezionare l'animale in 6 parti. Questo ha risolto il

problema della penetrazione omogenea della paraffina nel campione. La suddivisione dell'animale in 6 parti facilita l'individuazione degli organi di studio, conoscendone la posizione anatomica. Questo offre il vantaggio, rispetto al metodo B, di sezionare solo la parte di interesse. Le sezioni istologiche sono di ottima qualità e permettono inoltre uno studio topografico.

Il taglio lungo la linea alba prima ha favorito la fissazione degli organi interni, evitando o minimizzando l'autolisi che in questi campioni è rapida, specialmente a livello del tratto gastroenterico. Abbiamo applicato questa metodica in uno studio di fenotipizzazione di un nuovo ceppo transgenico di topi (dati non mostrati) in cui era sospetta l'agenesia renale. La possibilità di effettuare sezioni seriali nella zona di interesse ha permesso di avvalorare l'ipotesi, confermando la validità della nostra tecnica.

La parte A è attualmente l'unica che ha mostrato problemi simili ai campioni del gruppo B in fase di taglio. Probabilmente il cranio coperto da cute costituisce una barriera alla penetrazione della paraffina, rendendo il campione disomogeneo in densità. Nonostante le dimensioni limitate del campione, questo deve probabilmente essere ulteriormente sezionato.

In conclusione tecnica messa a punto nel terzo gruppo di animali si è rilevata tecnicamente semplice e istologicamente valida nel garantire sezioni di buona qualità morfologica, ad esclusione del cranio.

Bibliografia

1. Brighton C, Justice M, Montgomery CA: Evaluating mutant mice: anatomic pathology. Vet Pathol. 2001 Jan;38(1):1-19. Review.

**LESIONI DEL TRATTO GASTROENTERICO CORRELATE ALLA PROCEDURA
DI IRRADIAZIONE IN TOPI 129SVEV**

*Marchesi Francesco*¹, *Monestiroli Silvia*^{2,3}, *Gobbi Alberto*^{2,3}, *Capillo Manuela*^{2,3}, *Minucci Saverio*^{2,4},
Pellicci Pier Giuseppe^{2,3}, *Scanziani Eugenio*¹

- 1) Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare - Università degli Studi, Milano
- 2) Istituto Europeo di Oncologia - Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Milano
- 3) IFOM, Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milano
- 4) Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università degli Studi, Milano

Riassunto

Numerose sono le strategie sperimentali che consentono lo sviluppo di leucemie umane in modelli murini. Le strategie più recenti sono rappresentate dalla creazione di animali transgenici e dall'inoculo di topi irradiati con cellule ematopoietiche staminali murine trasdotte con vettori retrovirali veicolanti oncogeni o traslocazioni cromosomiche implicate nella patogenesi di leucemie umane. La procedura di irradiazione, volta ad eliminare le cellule del sistema linfoematopoietico del topo per consentire l'attecchimento delle cellule inoculate, presenta il problema dell'insorgenza di lesioni in tessuti dotati di intensa attività mitotica come la mucosa gastrointestinale.

Sono stati valutati retrospettivamente i reperti patologici a carico dell'apparato gastroenterico in 70 topi 129 SvEv impiegati nell'allestimento di modelli di leucemia mieloide e linfoma. Gli esperimenti implicavano un condizionamento tramite irradiazione.

In 7 casi è stata riscontrata un'enterocolite ulcerativa, in 5 casi tumori intestinali benigni (polipi adenomatosi), in 4 casi adenocarcinomi intestinali, in 1 caso un carcinoma squamoso dello stomaco anteriore, in 1 caso un polipo adenomatoso gastrico e in 33 casi iperplasia della mucosa dello stomaco ghiandolare.

I risultati del presente studio indicano che le lesioni gastroenteriche di tipo proliferativo e infiammatorio risultano frequenti in topi irradiati. Le analisi istopatologiche rivestono un ruolo centrale nella caratterizzazione degli esperimenti di leucemio-genesi e il patologo ha l'importante compito di identificare e diagnosticare con puntualità e consistenza le lesioni correlate ad

effetti collaterali legati al condizionamento tramite radiazioni ionizzanti.

Parole chiave: topo, irradiazione, tratto gastroenterico, lesioni

Summary

Irradiation-induced lesions of the gastrointestinal tract in 129SvEv mice. During the past decades many experimental strategies have been developed to establish murine models of human leukemias. The most frequently reported are the creation of transgenic mice or the retroviral transduction of murine hematopoietic progenitors and their subsequent injection into irradiated recipient mice. The irradiation procedures might induce a wide spectrum of lesions in radiosensitive tissues.

We retrospectively evaluated the lesions of the gastrointestinal tract in 70 irradiated 129SvEv mice employed in the establishment of human leukemias.

We observed 7 ulcerative enterocolitis, 5 intestinal adenomas (adenomatous polyps), 4 intestinal adenocarcinomas, 1 squamous cell carcinoma in the forestomach, 1 adenoma and 33 hyperplasias of the glandular stomach.

The results of the present study indicate that proliferative and inflammatory gastrointestinal lesions appear frequent in irradiated mice. We discuss our findings in the context of the role of the pathologist in the definition and characterization of the results of leukemogenesis experiments and in consistently diagnosing lesions related with the irradiation-conditioning procedures.

Key words: mouse, irradiation, gastrointestinal tract, lesions.

**VALUTAZIONE DEL POTENZIALE CANCEROGENO DI MELPHALAN
IN TOPI P53^{+/-}**

Argentino Storino Alberta

Research Toxicology Centre – Department of Pathology – Via Tito Speri, 12 – 00040 Pomezia (Roma)
Italy

Riassunto

Scopo dello studio è stato quello di valutare il potenziale cancerogeno del Melphalan in topi p53 eterozigoti, dosati settimanalmente via gavage per un periodo di 26 settimane consecutive. Il Benzene è stato impiegato come controllo positivo. I topi p53^{+/-} sono stati ottenuti dal ceppo selvaggio C57BL/6, knockout per l'allele del gene p53. Il Melphalan è un derivato fenilalaninico dell'iprite azotata ed è un agente alchilante, usato per il trattamento di patologie di natura proliferativa nell'uomo, tra cui il mieloma multiplo. Il potere mutageno della molecola è legato alla capacità di causare mono addotti del DNA e di cross-linking tra eliche. I dosaggi sono stati selezionati sulla base di uno studio preliminare di 4 settimane su topi appartenenti al ceppo selvaggio. Tre gruppi di topi P53N5-T provenienti da Taconic [C57BL/6TacfBR-(KO)p53 N5 eterozigoti], costituiti da 15 maschi e 15 femmine ciascuno, sono stati dosati, una volta a settimana mediante gavage, con 0.5, 1 e 2 mg/kg di Melphalan. Un quarto gruppo, costituito allo stesso modo, è stato utilizzato come controllo negativo, avendo ricevuto soltanto il veicolo. Gli animali del gruppo 5 (15 maschi e 15 femmine P53N5-T) sono stati dosati con 100 mg/kg di benzene, somministrato giornalmente per via orale, ed hanno rappresentato il controllo positivo. Due gruppi addizionali, ciascuno costituito da 15 topi maschi e 15 topi femmine P53N5-W, ottenuti da Taconic [C57BL/6TacfBR-(KO)p53 N5 wild-type] hanno ricevuto rispettivamente corn oil e 2 mg/kg/settimana di Melphalan.

Parole chiave: **cancerogenesi, Melphalan, topi p53^{+/-}**

Summary

Carcinogenicity assessment of melphalan in p53^{+/-} mice. The purpose of this study was to investigate the carcinogenic potential of Melphalan in p53^{+/-} heterozygous mice, when administered weekly by oral gavage for a period of 26 consecutive weeks. Benzene was used as the positive control. The p53^{+/-} mice were derived from the wild-type C57BL/6 carrying a knockout allele of p53 gene. Melphalan is a phenylalanine derivative of nitrogen mustard and it is an alkylating agent used in the treatment of selective human proliferative disease, including multiple myeloma. Mutagenicity is related to the ability to produce DNA mono-adducts and to form inter-strand cross links. The doses of Melphalan administered in this study were selected on the basis of results from a 4-week dose range finding study in wild-type mice. Three groups of 15 male and 15 female P53N5-T mice from Taconic [C57BL/6TacfBR-(KO)p53 N5 heterozygous] received 0.5, 1 and 2 mg/kg/week of Melphalan by oral gavage, while a fourth, similarly constituted group, received the vehicle alone (corn oil) and acted as a negative control. A positive control group of 15 male and 15 female P53N5-T mice received 100 mg/kg/day of Benzene orally. Two additional groups, each of 15 male and 15 female P53N5-W mice from Taconic [C57BL/6TacfBR-(KO)p53 N5 wild-type] received corn oil and 2 mg/kg/week of Melphalan, respectively.

Key words: carcinogenicity, Melphalan, p53^{+/-} mice.

VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE IN TOPI SJL/J CON EAE (ENCEFALOMIELE ALLERGICA SPERIMENTALE) INDOTTA E TRATTATI PER TEMPI PROLUNGATI CON CORTISONICI.

Pellegrini Giovanni, Pacelli Vanessa, Andreini Isabella

Research Toxicology Centre – Department of Pathology – Via Tito Speri, 14 – 00040 Pomezia (Roma)
Italy

Riassunto

Il presente studio è stato condotto utilizzando topi di sesso femminile, appartenenti al ceppo SJL/J. In questi animali è stata indotta l'encefalomielite allergica sperimentale, modello animale per lo studio della sclerosi multipla dell'uomo. La patologia è stata riprodotta nel topo in seguito alla somministrazione ripetuta della proteina basica della mielina (MBP), componente principale della guaina mielinica. Come effetto dell'immunizzazione si è assistito ad un decorso clinico della malattia di tipo remittente, che ricaccla da vicino quanto si osserva frequentemente nei pazienti affetti da sclerosi multipla. Lo studio includeva 4 gruppi di trattamento: un controllo negativo in cui gli animali non sono stati immunizzati con MBP, un gruppo di riferimento positivo dove è stata indotta l'encefalomielite senza alcun successivo trattamento, un gruppo con encefalomielite indotta e trattamento prolungato in acqua da bere con Desametazone ed infine un gruppo con encefalomielite indotta e trattamento con Deflazacort somministrato allo stesso modo del precedente. Gli animali venivano pesati settimanalmente ed osservati giornalmente per circa 2 mesi dalla prima immunizzazione, allo scopo di registrare i segni clinici insorti. La severità della sintomatologia è stata classificata utilizzando una scala di punteggi da 1 a 5. Alla fine del trattamento, i topi sono stati anestetizzati e si è proceduto alla perfusione attraverso il cuore con formalina: l'encefalo e il midollo spinale sono stati asportati, inclusi in paraffina, sezionati a 5 micron e colorati con ematossilina-eosina. Il presente lavoro riporta le conclusioni elaborate in seguito all'indagine istopatologica.

Parole chiave: EAE, Cortisonici, Desametazone, Deflazacort, SNC.

Summary

Histopathology of nervous tissue in SJL/J mice with induced eae (experimental allergic encephalomyelitis) following chronic cortisone treatment. EAE (Experimental Allergic Encephalomyelitis), animal model for human MS (Multiple Sclerosis) was induced in SJL/J female mice by repeated administration of MBP (Myelin Basic Protein), the main component of the myelin sheath. The immunisation induced a remitting non-relapsing form of disease, which mimics closely the clinical manifestations of human multiple sclerosis (MS). In the present study, animals were divided into four treatment groups, negative control (no MBP immunisation), reference group (induced EAE, no therapy), Dexamethasone group (induced EAE + chronic Dexamethasone treatment in drinking water) and Deflazacort group (induced EAE + chronic Deflazacort treatment in drinking water). Animals were weighed and examined for development of clinical symptoms daily from the first immunisation (day 0) for approximately 2 months. The severity of EAE was scored clinically on a scale of 0 to 5. At the end of the study animals were deeply anaesthetised, perfused with formalin through the heart, and spinal cord and brain were removed, embedded in paraffin wax and cut to 5 µm in thickness, stained with hematoxylin&eosin, and examined. In the present communication we report the results of these analyses.

Key words: EAE, Cortisone, Desametazone, Deflazacort, CNS.

**VALUTAZIONE MICROSCOPICA DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO
MEDIANTE TECNICHE DI ISTOCIMICA**

*Argentino-Storino Alberta[°], Manno R.A.[°], Pesce D. *, Perna E.**

[°] Research Toxicology Centre – Department of Pathology – Via Tito Speri, 12 – 00040 Pomezia (Roma)
Italy

* Sigma-Tau – Research & Development – Via Pontina Km 30,400 – 00040 Pomezia (Roma) Italy

Riassunto

La distribuzione anatomica e l'organizzazione del sistema nervoso periferico rendono questo tessuto particolarmente adatto a mostrare lesioni riferibili a fenomeni di neurotossicità: per questa ragione esso viene incluso di routine nella lista di organi/tessuti valutati per ricercare danni a carico delle fibre nervose e delle componenti gangliari. Le innovative metodiche impiegate oggi in neuropatologia forniscono risultati ottimali per quanto concerne la valutazione microscopica della neurotossicità. L' esame istopatologico standard dei nervi periferici, condotto cioè su campioni inclusi in paraffina e colorati con ematossilin-eosina, non consente sempre una chiara interpretazione della localizzazione e dell'estensione delle lesioni. Le metodiche istochimiche per la determinazione di enzimi ed una particolare tecnica (teased-fiber technique) di valutazione delle fibre nervose, sono metodiche complementari all'istopatologia. Esse peraltro possono essere limitate ad un numero esiguo di campioni, allo scopo di caratterizzare meglio le lesioni a carico dei tessuti. Ciò permette di limitare il carico di lavoro e tenere sotto controllo i costi. Col presente lavoro vengono presentati alcuni risultati ottenuti applicando le metodiche citate in precedenza.

Parole chiave: neurotossicità, fibre nervose

Summary

Microscopic evaluation of peripheral nerve toxicity by enzyme-histochemical assessment.

The anatomical distribution and organisation of the peripheral nervous system as well as its frequent ability to reflect neurotoxic injury justify the routine evaluation of nerve fiber and ganglionic lesions. Contemporary neuropathological techniques provide sections with excellent light-microscopic resolution for use in making such assessments.

Routine histopathological evaluation of peripheral nerve (paraffin embedding, hematoxylin&eosin staining) does not allow clear identification of the overall location and relative extent of lesions as they relate to neural substructures. Enzyme-histochemical assessment and teased-fiber technique are complementary to histopathology, and in order to limit the workload and save costs, they can be performed on only a few specimens selected for better characterisation of changes recognised or suspected in tissue sections.

Key words: teased-fiber technique, neurotoxicity.

L'AZA-ANTHRACENEDIONE PIXANTRONE (BBR 2778) CONFERMA IL SUO RIDOTTO POTENZIALE CARDIOTOSSICO VS. STANDARDS DI RIFERIMENTO ANCHE IN TOPI PRE-TRATTATI CON DOXORUBICINA

Crippa Luca

Cell. Therapeutics, Inc - Europe, Bresso (MI) Italy

Riassunto

Pixantrone (BBR 2778, Pix) è un nuovo aza-antracenedione ad attività antitumorale con un basso potenziale cardi tossico nell'animale sano, oggi in fase clinica III per il trattamento nell'uomo di NHL. Al fine di confermare il basso potenziale cardi tossico di Pix anche in condizioni sfavorevoli come quelle che si possono incontrare nel corso degli studi clinici (dove i pazienti ricevono Pix dopo aver già assunto trattamenti potenzialmente cardi tossici di Doxorubicina), Pix era somministrato, in confronto con Mitoxantrone (Mitox) e Doxorubicina (Doxo), in animali pre-trattati con dosi cardi tossiche note di Doxo. Nello stesso studio il potenziale cardi tossico di Pix era anche investigato, in confronto con Doxo e Mitox, come singolo agente.

Topi femmina CD1, pre-trattati iv con un ciclo ripetuto (q7dx3) di Doxo alle dosi cardi tossiche di 4.6 e 7.5 mg/kg/die, ricevevano dopo un intervallo di 6 settimane un secondo ciclo di trattamento ripetuto iv (q7dx3) con Pix (27 mg/kg/die), Mitox (3mg/kg/die) e Doxo (4.6 e 7.5 mg/Kg/die). Come singoli agenti, topi femmina CD1 ricevevano due cicli di trattamento iv (q7dx3) separati da un intervallo di 6 settimane di Doxo (alle dosi di 4.6 e 7.5 mg/kg/die), Mitox (3mg/kg/die) e Pix (27mg/kg/die). Per ogni gruppo le lesioni cardiache indotte dal trattamento sono state valutate istologicamente con il metodo di Bertazzoli et al.(1978) dopo 6 settimane dal primo ciclo e dopo 6 settimane dal secondo ciclo di trattamento.

Il pre-trattamento con le due dosi di Doxo induceva miocardiopatia degenerativa dose-dipendente da lieve a moderata. Tale miocardiopatia degenerativa non era aggravata dal secondo ciclo di trattamento con Pix, mentre era evidentemente peggiorata dal secondo ciclo di trattamento con Doxo e Mitox. Come agenti singoli: Pix non induceva lesioni cardi tossiche apprezzabili, mentre Doxo e Mitox causavano miocardiopatia degenerativa da moderata a marcata.

In conclusione, i risultati ottenuti confermano il basso potenziale cardi tossico di Pix vs. gli

standard di riferimento anche in animali pre-trattati con dosi cardi tossiche di Doxo suggerendo così il suo possibile uso anche in pazienti cardiopatici pre-trattati con Doxo senza aggravare la miocardiopatia pre-esistente.

Parole chiave : Cardiotoxicità, Doxorubicina, modelli preclinici, topo

Summary

The aza-anthracenedione Pixantrone (BBR 2778) confirms its reduced cardiotoxic potential vs. reference standards also in mouse pre-treated with Doxorubicin Pixantrone (BBR 2778, Pix) is a new aza-anthracenedione with a favourable preclinical anticancer efficacy and a reduced cardiotoxic potential in healthy animals, currently in a phase III clinical trial for the treatment of NHL. To closely mimic the situation occurring in patients pre-treated with cardiotoxic doses of Doxorubicin, the intrinsic cardiotoxic potential of an iv treatment (q7dx3) of Pix (27 mg/kg/day), in comparison to Mitox (3 mg/kg/day) and Doxo (4.6 and 7.5 mg/kg/day), was investigated in CD1 female mice iv (q7dx3) pre-treated with cardiotoxic doses of Doxo. In the same study cardiotoxic potential of Pix, vs. Doxo and Mitox, was also investigate as single agent. In both setting, cycles were spaced by a treatment-free period of 6 weeks and cardiotoxicity was histopathologically evaluated 6 weeks after the end of the 1st cycle and 6 weeks after the end of the 2nd cycle. Myocardial changes were scored according to Bertazzoli's method. In conclusion, the obtained results confirm the reduced cardiotoxic potential of Pix vs. reference standards also in animals pre-treated with cardiotoxic doses of Doxo, thus suggesting its possible use in patients heavily pre-treated with cardiotoxic agents such as Doxo or Mitox without worsening the pre-existing treatment-related cardiomyopathy.

Key words: Cardiotoxicity, Doxorubicin, preclinical models, mouse.

**CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA DI UN CARCINOMA OVARICO UMANO
TRANSFETTATO CON VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR
E TRAPIANTATO IN TOPI NUDI**

*Riccardi Elena¹, Belluco Sara¹, Manenti Luigi², Marchini Sergio², Scanziani Eugenio¹
Giavazzi Raffaella²*

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Oncologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Bergamo e Milano

Riassunto

Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) riveste un ruolo fondamentale nella neoangiogenesi tumorale. Denominato anche Vascular Permeability Factor (VPF), il VEGF è responsabile della vasopermeabilizzazione e dell'accumulo di ascite nelle pazienti affette da carcinoma ovarico. Per valutare il ruolo di VEGF nel comportamento biologico del carcinoma ovarico, sono stati usati modelli di trapianto "xenografts" sottocutaneo ed intra peritoneale (i.p.) ottenuti da tre varianti cellulari di carcinoma ovarico umano che si differenziano per la produzione di VEGF: 1A9 (linea parentale), 1A9-VS1 (linea transfettata con VEGF₁₂₁) e 1A9-VAS3 (linea transfettata con VEGF₁₂₁ anti-senso). La morfologia dei tumori è stata valutata istologicamente. Le proprietà angiogenetiche delle tre linee sono state valutate mediante la colorazione immunohistochimica per l'antigene CD31. La stadiazione della neoplasia è stata effettuata tramite analisi macroscopica e microscopica degli organi della cavità peritoneale. La produzione di VEGF è stata misurata nel plasma di animali portatori di tumore mediante ELISA. La linea 1A9-VS1 inoculata sottocute nel topo nudo è cresciuta più rapidamente rispetto alle altre due varianti. Non si sono riscontrate differenze per quanto riguarda la morfologia dei tumori e il numero di vasi. Tuttavia, nei tumori formati da 1A9-VS1 è stata riscontrata una marcata eterogeneità nel calibro dei vasi ed una grave angiectasia. Le tre varianti trapiantate i.p. hanno disseminato allo stesso modo negli organi della cavità peritoneale e le dimensioni delle metastasi sono risultate tempo-correlate. Solo gli animali inoculati con 1 A9-VS1 hanno manifestato ascite; l'analisi istologica delle ovaie di questi soggetti ha rivelato la presenza di una tipica lesione caratterizzata da grave angiectasia e atrofia del parenchima. Solo i soggetti portatori di tumore 1A9-

VS1 avevano livelli plasmatici di VEGF rilevabili. Il tumore 1A9-VS1 che produce alti livelli di VEGF cresce rapidamente nel topo nudo, causa ascite e determina l'insorgenza di gravi alterazioni vascolari, selettivamente a carico dell'ovaio.

Parole chiave: VEGF, carcinoma ovarico, angiectasia

Summary

Histological characterization of human ovarian carcinoma xenografts over-expressing Vascular Endothelial Growth Factor. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), also known as Vascular Permeability Factor (VPF) plays an important role in tumor neoangiogenesis. Association between ascites formation and VEGF has been reported in experimental models and in ovarian cancer patients. We have developed a model of human ovarian carcinoma with 1A9 cells stable transfected with VEGF₁₂₁ (1A9-VS1) and with antisense VEGF₁₂₁ (1A9-VAS3). 1A9-VS1 transplanted subcutaneously showed a fast tumor growth and high plasma VEGF (measured by ELISA). Histological examination of 1A9-VS1 tumors showed heterogeneity in blood vessel size and frequently marked vessel dilatation. The growth of 1A9-VS1 in peritoneal cavity of nude mice caused peritoneal fluid accumulation and high VEGF levels in plasma and ascites. Histological examination showed a time-related increase in the widespread of tumoral implants in the peritoneal cavity for all the xenografts. Only the ovaries of 1A9-VS1 tumor bearing mice showed a typical lesion

characterized by angiectasis and atrophy of ovarian parenchyma.

In conclusion we found that in 1A9-VS1 tumor bearing mice VEGF caused ascites formation and a selective vascular lesion in the ovary.

Key words: VEGF, ovarian carcinoma, angiectasis.

Introduzione

Il Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) appartiene ad una famiglia di geni di cui fanno parte anche il Platelet Derived Growth Factor (PDGF), il VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e il VEGF-E. Il VEGF-A umano codifica per diverse isoforme di VEGF (121, 165, 189, 206) che si differenziano in base al peso molecolare. Il VEGF è un fattore di crescita che svolge diverse attività sulla cellula endoteliale attraverso il legame con tre recettori tirosin-chinasici (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) e con le Neuropiline. VEGF sulla cellula endoteliale è promotore in vitro, mentre in vivo induce vasodilatazione e vasopermeabilizzazione. Il VEGFR-2 interviene nel processo di vasculogenesi embrionale, mentre il VEGFR-1 interviene nel processo di rimodellamento e consolidamento dei vasi formati (1).

Come fattore di crescita pro-angiogenetico, VEGF è implicato nel processo di sviluppo e differenziazione degli organi durante la vita embrionale, nel processo di guarigione delle ferite e in altri eventi patologici su base angiogenetica e nell'angiogenesi tumorale (2).

Alti livelli di espressione di VEGF sono stati riscontrati nel carcinoma ovarico umano e in altri tumori solidi (3). L'overespressione tumorale di VEGF è stata anche correlata a prognosi infausta (4). È riportata in letteratura la presenza di un'associazione tra la formazione di ascite e il VEGF (5). Una relazione tra i livelli plasmatici di VEGF e la formazione di ascite è stata descritta in pazienti affette da carcinoma ovarico (6). Inoltre, l'impiego di farmaci che inibiscono l'azione di VEGF ha determinato una drastica riduzione della formazione di ascite (7).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se e come l'espressione di VEGF influenza la vascolarizzazione e la metastatizzazione di cellule di carcinoma ovarico.

Materiali e metodi

Linee cellulari

Le cellule di carcinoma ovarico umano della linea 1A9 sono state transfettate con il DNA che codifica per la isoforma 121 di VEGF (1A9-VS1). La transfezione con il DNA antisense ha generato una linea, la 1A9-VAS3, che non esprime VEGF₁₂₁.

Xenografts

Per valutare il comportamento biologico dei tre cloni cellulari sono stati allestiti un modello di trapianto "xenograft" sottocutaneo (s.c.) e uno intraperitoneale (i.p.) inoculando rispettivamente s.c. e i.p. 10×10^6 cellule per animale.

Analisi istologica

Gli animali inoculati s.c. sono stati sacrificati quando i tumori raggiungevano il peso di 200, 500 e 1200mg. Una parte di ogni tumore è stata fissata in formalina, mentre una parte in fissativo di zinco.

Gli animali inoculati i.p. sono stati sacrificati al giorno 7, 14 e 21 dall'inoculo. Dopo analisi macroscopica del coinvolgimento della cavità addominale, sono stati prelevati diaframma, fegato, milza, pancreas e ovaie e fissati in formalina.

I campioni sono stati processati come di routine per l'istologia. I campioni fissati in formalina sono stati valutati su sezioni colorate con Ematossilina-Eosina.

Analisi immunoistochimica, densità vasale e analisi d'immagine

I campioni fissati in zinco sono stati sottoposti ad analisi immunoistochimica per l'antigene CD31 utilizzando un anticorpo monoclonale rat anti-mouse (PharMingen, San Diego) alla diluizione 1:50.

Le sezioni immunoistochimiche sono state valutate preventivamente a 40-100X e sono state scelte le 3 aree più densamente vascolarizzate (hot-spot). Sono stati contati i vasi positivi presenti in ciascuna area a 400X (8, 9) e sono state calcolate le medie e le deviazioni standard per ciascun gruppo.

Per ogni sezione di tumore sono state acquisite 4 immagini a 100X. In ogni immagine è stato misurato manualmente il diametro dei vasi positivi. Sono state quindi calcolate le medie e le deviazioni standard per ciascun gruppo.

Crescita i.p. e stadiazione

Sulla base delle dimensioni delle metastasi tumorali riscontrate all'analisi macroscopica e microscopica e dell'invasione degli organi della cavità addominale, il tumore è stato studiato nel modo seguente:

T₀= assenza di metastasi o presenza di noduli di 10 cellule solo a livello omentale

T₁= presenza di noduli di 10-100 cellule solo a livello omentale

T₂= presenza di noduli di più di 100 cellule solo a livello omentale

T₃= presenza di masse visibili macroscopicamente e/o invasione di almeno un altro organo della cavità addominale

T₄= presenza di masse visibili macroscopicamente e/o invasione di due o più organi

ELISA

In entrambi i modelli sono stati misurati i livelli plasmatici e del liquido ascitico di VEGF tramite metodica immunoenzimatica.

Risultati

Analisi istologica

Non si sono riscontrate differenze nell'aspetto dei tumori sottocutanei delle tre diverse linee cellulari. Tuttavia i tumori della linea 1A9-VS1 mostravano una grande variabilità nel calibro dei vasi e una grave angiectasia.

Analisi immunohistochimica, densità vasale e analisi d'immagine

I reperti riscontrati sulle sezioni colorate con Ematossilina-Eosina sono stati confermati anche dall'analisi immunohistochimica (Fig 1 e 2) ed avvalorati dall'analisi d'immagine. L'elevato calibro dei vasi era più evidente nei tumori della linea 1A9-VS1 prelevati a 200mg e 500mg (Grafico 1). Non si sono riscontrate sostanziali differenze tra le linee per quanto concerne le proprietà angiogenetiche.

Crescita i.p. e stadiazione

La crescita del tumore nella cavità peritoneale è risultata tempo-correlata per tutti e tre i cloni cellulari (Grafico 2). Tuttavia gli animali inoculati con le cellule della linea 1A9-VS1 hanno mostrato un tempo di sopravvivenza minore e sono gli unici ad aver manifestato ascite.

Inoltre solo gli animali inoculati con le cellule della linea 1A9-VS1 mostravano a livello ovarico una particolare lesione vascolare caratterizzata da grave angiectasia e atrofia del parenchima (Fig 3 e 4).

ELISA

In entrambi i modelli livelli misurabili di VEGF sono stati riscontrati solo nel plasma e nel liquido ascitico degli animali inoculati con il clone 1A9-VS1. L'incremento di VEGF è risultato correlato alla crescita del tumore.

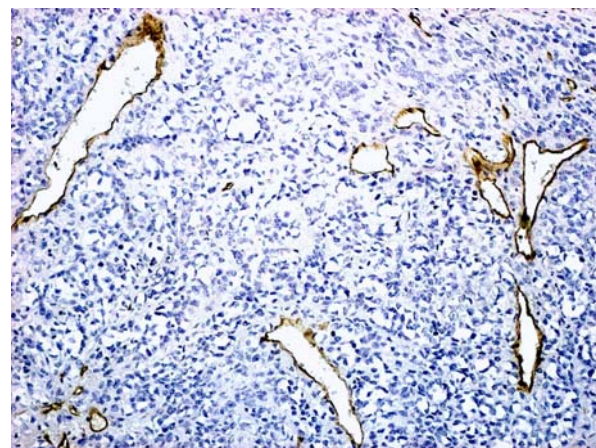


Figura 1

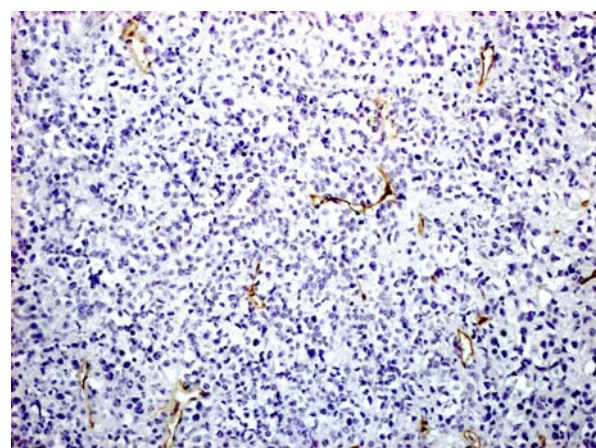


Figura 2

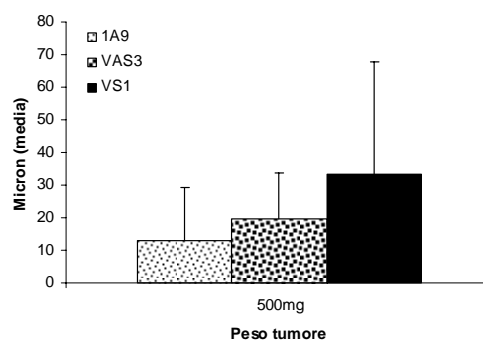


Grafico 1

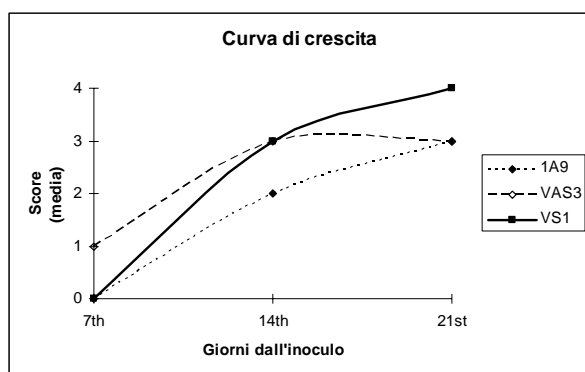


Grafico 2

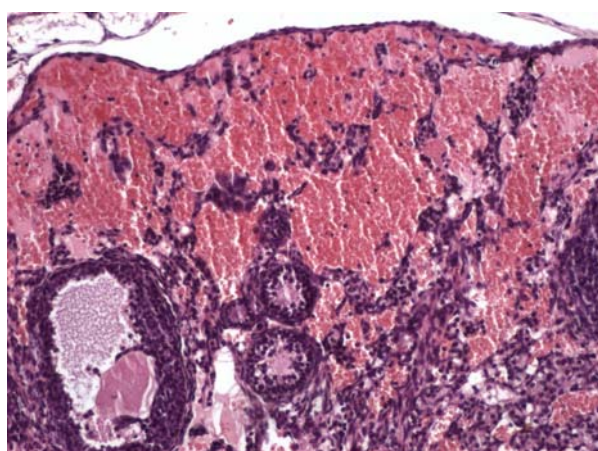


Figura 3

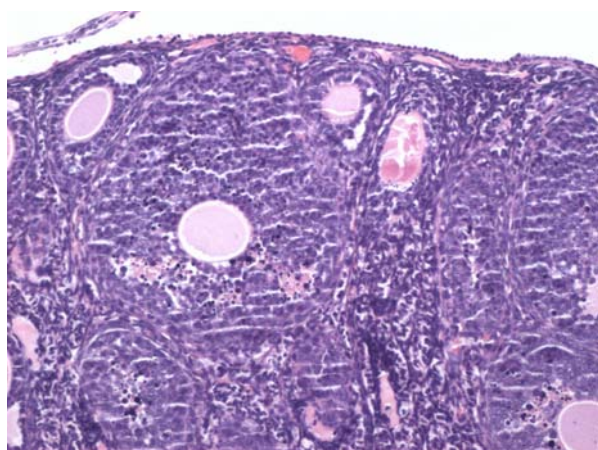


Figura 4

Discussione

La linea 1A9-VS1, trasfettata con VEGF₁₂₁ e inoculata sottocute determina la formazione di tumori solidi caratterizzati da grave angiectasia ed elevata eterogeneità nel calibro dei vasi (Fig 1 e 2). A fronte delle note proprietà angiogenetiche di VEGF, non

abbiamo riscontrato differenze nel numero di vasi tra le tre diverse linee cellulari. I nostri risultati sono in accordo con precedenti studi che descrivono come l'over-espressione di VEGF₁₂₁ induca proliferazione delle cellule endoteliali e dilatazione dei vasi in assenza di angiogenesi (10, 11).

L'over-espressione del VEGF sembra quindi promuovere la crescita del tumore attraverso la modulazione dei vasi dell'ospite come descritto da Kusters *et Al* (12) nel loro modello di melanoma. Tuttavia in letteratura sono riportati lavori contraddittori sul ruolo di VEGF nell'angiogenesi tumorale. Kondo *et Al* (13) infatti descrivono le proprietà angiogenetiche di VEGF₁₂₁ nel loro modello di "xenograft" sottocutaneo di carcinoma umano del colon. Tutte queste osservazioni sottolineano che sono necessari ulteriori studi per fare chiarezza sul complesso ruolo svolto da VEGF nell'angiogenesi tumorale.

La metastatizzazione tumorale seguita all'inoculo delle cellule a livello intra-peritoneale richiama la carcinomatosi peritoneale tipica del carcinoma ovarico umano allo stadio III (14). In un ambiente ben vascolarizzato come la cavità peritoneale, le cellule tumorali hanno la possibilità di crescere tramite il reclutamento dei vasi pre-esistenti. Le masse omentali sono caratterizzate da aree di necrosi variabili in dimensioni e distribuzione. I vasi sono più uniformi e spesso sono localizzati al centro di un vallo di cellule tumorali vitali (15). Non si sono peraltro riscontrati segni di angiogenesi alla periferia delle masse (data not shown). Questi aspetti sono caratteristici delle masse date da tutti e tre i cloni cellulari.

Solo gli animali inoculati con le cellule della linea 1A9-VS1 presentavano ascite.

Sulla base di questi reperti si può ipotizzare che l'effetto dell'over-produzione di VEGF è completamente rivolto ai vasi del mesentere e della parete addominale e determina vasopermeabilizzazione e conseguente accumulo di liquido ascitico.

In questo modello abbiamo inoltre descritto una particolare lesione confinata ai vasi dell'ovaio degli animali inoculati con la linea 1A9-VS1 (Fig 3 e 4). La crescita follicolare a

livello ovarico dipende anche dalla neo-angiogenesi (16) che sembra inoltre correlata ad un aumento dell'espressione di VEGF (17). Infatti la somministrazione di farmaci anti-VEGF è correlata ad un ritardo nella crescita follicolare sia nei primati che nei roditori (18).

In letteratura è riportato che il VEGF può indurre la formazione di strutture vascolari aberranti e di emangiomi (19). A supporto dell'ipotesi che l'overproduzione di VEGF da parte delle cellule della linea 1A9-VS1 giochi un ruolo chiave nel determinare questa lesione, segnaliamo che l'angiectasia era correlata alla crescita dei livelli plasmatici di VEGF in questi animali.

Concludendo, il VEGF misurato nel plasma nel nostro modello è un marcatore del carico tumorale.

Bibliografia

1. Ferrara N. *Science*, 9(6):669-676, 2003.
2. Folkman J. *Science*, 235:442-447.
3. Boock C. A. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 87: 506-516, 1995.
4. Ishigami SI, Imamura M. *Br J Cancer*, 78(10):1379-1384, 1998.
5. Nagy J. A. *Cancer Res.*, 55: 360-368, 1995.
6. Manenti L. *Eur J Cancer*. 2003 Sep;39(13):1948-56.
7. Xu L. *Int. J. Oncol.*, 16: 445-454, 2000.
8. Weidner N. *N. Engl. J. Med.*, 324: 1-8.
9. Hansen S. *Lab. Invest.*, 78: 1563-1573.
10. Yu J.L. *Cancer res.*, 62:1838-1846, 2002.
11. Kösters B. *Cancer res.*, 63:5408-5413, 2003.
12. Kusters B. *Cancer res*, 62:341-345, 2002.
13. Kondo Y. *Clin. Cancer Res.*, 6:622-630, 2000.
14. Cotran R.S. *Neoplasia in Robbins-Pathologic Basis of Disease*, 6°edizione, pg 269.
15. Holash J. *Science*, 284:1994-1998, 1999.
16. Goede V. *Lab. Invest.*, 78:1385-1394, 1998.
17. Philips HS. *Endocrinology*, 127:965-967, 1990.
18. Zimmermann R.C. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86:768-772, 2001.
19. Ozawa CR. *J Clin Invest*, 113(4):516-527, 2004.

***PATOLOGIA SPONTANEA IN UNA COLONIA DI MARMOSET COMUNI
(CALLITHRIX JACCHUS)***

Lanzoni Anna, Piaia Alessandro, Paschetto Silvia, Cristofori Patrizia

Pathology Department, Safety Assessment, GlaxoSmithKline, Via Fleming, 4, Verona Italy

Riassunto

Il marmoset (*Callithrix jacchus*) e' un primate del Nuovo Mondo usato negli studi preclinici e quale modello sperimentale nella ricerca. L'allevamento in condizioni di cattività e' possibile, e permette la creazione di colonie molto controllate dal punto di vista microbiologico e parassitario, a differenza di altre specie di primati di cattura. In questo lavoro vengono presentati alcuni quadri anatomo-patologici ascrivibili a patologia spontanea osservati in una colonia di marmoset di 13-15 anni di età stabulati nel nostro laboratorio.

Parole chiave: marmoset, patologia spontanea.

Summary

Spontaneous pathology in a common marmoset (*Callithrix jacchus*) colony The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is a New World primate used in preclinical studies and as research experimental model. The breeding in laboratory facilities is feasible and allows a good microbiological and parasitological control of the colonies, differently from wild-caught primates. In the present work we present some anatomo-pathological changes attributable to spontaneous pathology in a colony of 13-15 year –old marmoset bred in our facilities.

Keywords: marmoset, spontaneous pathology.

LESIONI SPONTANEE IN RATTI SPRAGUE-DAWLEY UTILIZZATI IN STUDI PRELIMINARI DI TOSSICOLOGIA

Piaia Alessandro, Lanzoni Anna, Faustinelli Ivo, Cristofori Patrizia

Safety Assessment Dept. Histopathology Medicine Research Center – GlaxoSmithKline, via A. Fleming, 4 – Verona, Italia

Riassunto

Lo Sprague-Dawley è il ceppo di ratti maggiormente utilizzato nell'industria farmaceutica per gli studi di tossicologia. Questi animali possono presentare lesioni spontanee correlate all'invecchiamento ma le stesse possono comparire in ratti più giovani, con età di circa 12 settimane, quando molti esemplari vengono sottoposti a valutazione istopatologica. Le lesioni più frequentemente osservate sono rappresentate da quadri spontanei di degenerazione e/o reazione infiammatoria a carico di alcuni parenchimi, in particolare fegato, polmoni e cuore. Nel fegato, si possono osservare focolai di necrosi emorragica caratterizzati da aspetti di necrosi coagulativa, emorragia e infiltrazione mista di cellule infiammatorie. È poi possibile il rilievo di una vacuolizzazione degli epatociti negli animali messi a digiuno dalla sera precedente. Nei polmoni, manicotti infiammatori perivascolari/peribronchiali possono essere presenti, talvolta in associazione a quadri di reattività rappresentati da iperplasia degli pneumociti di secondo ordine e da accumulo di macrofagi alveolari schiumosi. Per questi quadri, alcune pubblicazioni ne rimarcano la frequente incidenza e l'incerta origine eziologica. Nel cuore, focolai singoli o multipli di degenerazione cardiopatica possono essere osservati ma senza una specifica topografia per i diversi settori cardiaci. La presenza di tutte queste lesioni può simulare una incidenza correlata al trattamento, soprattutto in virtù della sporadicità nella loro comparsa e del ridotto numero di animali utilizzati negli studi preliminari di tossicologia. A ragione di ciò, queste lesioni devono essere considerate attentamente per evitare forvianti interpretazioni dei quadri lesivi così come interpretare correttamente esacerbazioni di quadri lesivi spontanei riferibili al trattamento.

Parole chiave: Sprague-Dawley/patologia spontanea/fegato/polmone/cuore.

Summary

Background findings in sprague-dawley rats commonly used in preclinical studies. Sprague-Dawley rat is one of the rat strains most frequently used in pharmaceutical companies for toxicological studies. Spontaneous lesions commonly increase with age, however some of them are already present in 12-week old animals, age around which rats are often submitted to histopathological evaluation. We commonly observe spontaneous inflammatory and/or degenerative lesions in organs such as liver, lungs and heart. In the liver, haemorrhagic-necrotic foci can be present, characterised by aspects of coagulative necrosis, haemorrhage and infiltration of mixed inflammatory cells. Fine hepatocellular vacuolation can also be observed in overnight-starved animals. In the lungs, perivasculare/peribronchial inflammatory cell, sometime in association with hyperplasia of alveolar type 2 cells and foamy macrophages, can be observed. For this finding there are many references that state the unknown etiology, in despite of their relative frequent occurrence. In the heart, focal to multifocal foci of cardiomyopathy can be noted without any consistent localisation. The low incidence and severity of these findings sometimes mimic a treatment relationship, making difficult the pathologist assessment. Therefore they should be taken under special attention in order to rule out any treatment-related condition from a spontaneous occurrence or an exacerbation of a background findings.

Key words: Sprague-Dawley/background pathology/liver/lung/heart.

MODELLI ANIMALI DI TUMORE

Giusti Anna Maria, Andrea Terron

NERVIANO MEDICAL SCIENCE - Viale Pasteur 10 - 20014 Nerviano (Mi) – Italy

Riassunto

Gli animali da laboratorio sono stati intensamente utilizzati in tutti i campi della ricerca biomedica. In campo oncologico, lo sviluppo di modelli che mimino la patologia umana è di importanza fondamentale per caratterizzare *in vivo* l'efficacia e gli effetti collaterali di nuovi composti, dopo che la loro efficacia sia stata dimostrata *in vitro*. Diversi modelli animali di tumore sono stati utilizzati sino ad ora con questo scopo, e ne viene qui presentata una breve descrizione. Tumori autoctoni possono essere indotti in seguito ad esposizione a diverse sostanze cancerogene, come il colon carcinoma da AOM o il carcinoma al polmone da NNK in topi A/J. Un diverso approccio è utilizzato nei modelli di trapianto eterologo nei topi nudi, nei quali diverse linee cellulari neoplastiche di origine umana vengono impiantate sottocute, e l'inibizione della loro crescita a seguito del trattamento può essere direttamente monitorata. Un'alternativa all'impianto sottocutaneo è l'impianto diretto delle cellule della linea tumorale nell'organo bersaglio. Questo modello ortotopico permette di ottenere risposte biologiche e terapeutiche più simili a quanto visto nei tumori umani. Più recentemente, il contributo della tecnologia transgenica ha permesso di aumentare notevolmente le possibilità di ricerca per l'industria farmaceutica, permettendo di creare modelli animali di tumore con un approccio ancora più mirato per l'identificazione e validazione dei target molecolari e la valutazione preclinica di efficacia di nuovi farmaci. Sono descritti topi transgenici TRAMP ed MMTV/v-Ha-ras.

Parole chiave: modelli animali di tumore, tumori indotti chimicamente, tumori eterotopici, tumori ortotopici, topi transgenici

Summary

Animal tumor models. Laboratory animals have been intensively used in all fields of biomedical

research. In oncology, the development of relevant models mimicking the human disease is of paramount importance to characterize *in vivo* efficacy and adverse effects of candidate drugs once antitumor effects have been demonstrated *in vitro*. Different animal models of tumors have been used so far with this purpose and a short overview is presented here. Autochthonous neoplasms can be induced in animals following chemical exposure to different carcinogens, such as DMBA-induced mammary carcinoma in Sprague Dawley rats, AOM-induced colon carcinoma in A/J mice, NNK-induced lung carcinoma in A/J mice. A different approach is used in the xenograft models, where a large number of different human tumor cell lines can be implanted subcutaneously in nude mice and the inhibition of their growth easily monitored. An alternative to xenograft subcutaneous implantation systems are the orthotopic models, in which human tumor cell lines are directly implanted in the target organ in nude mice. These result in a more suitable human tumor model appropriate to the study of the biology and therapeutic response of various metastatic cancers. More recently, the contribution of transgenic technology has greatly improved the possibility of a rational drug discovery approach for the pharmaceutical industry, allowing a target-oriented approach for the identification and validation of molecular drug targets and evaluation of preclinical tumor efficacy. Examples of TRAMP and MMTV/v-Ha-ras transgenic mice are given.

Keywords: animal tumor models, chemically induced tumors, xenograft tumors, orthotopic tumors, transgenic mice

Introduzione

Gli animali da laboratorio sono stati intensamente utilizzati in tutti i campi della ricerca biomedica. In campo oncologico, lo sviluppo di modelli che mimino la patologia umana è di fondamentale

importanza per caratterizzare in vivo l'efficacia di nuovi composti una volta che i loro effetti antitumorali sono stati dimostrati *in vitro*. Diversi modelli animali di tumore sono stati utilizzati sino ad ora con questo proposito (Harrison S., 2002), ed è qui presentata una breve rassegna.

Come patologi siamo coinvolti nella messa a punto del modello, ovvero nella valutazione di diversi parametri essenziali per evidenziare i momenti critici per la terapia e la valutazione qualitativa e quantitativa di markers di efficacia quali: riduzione di volume del tumore, caratteristiche morfologiche del tumore, estensione delle aree necrotiche, indice di proliferazione cellulare (utilizzando tecniche di immunistochemica in animali trattati *ante mortem* con BrdU), indice apoptotico (TUNEL), grado di angiogenesi (utilizzando un'immunistochemica con anticorpo per CD31).

Modelli di trapianto eterologo

Nei modelli di di trapianto eterologo, i cosiddetti xenograft, linee cellulari neoplastiche di origine umana vengono impiantate sottocute in animali immunodeficienti, generalmente topi nudi, e la progressione del tumore, come pure l'inibizione della crescita tumorale in seguito a trattamento, possono essere direttamente monitorate tramite osservazione diretta e misurazione del volume del tumore.

Un'alternativa all'impianto sottocutaneo è l'impianto delle cellule della linea tumorale direttamente nell'organo bersaglio. Questo modello ortotopico permette di ottenere risposte biologiche e terapeutiche più simili a quanto visto nei tumori umani.

I modelli di trapianto eterologo sono stati i modelli maggiormente utilizzati negli ultimi vent'anni nel campo della ricerca oncologica, sono economici, di facile induzione e riproducibilità in diversi laboratori, e permettono una facile e veloce misurazione dei parametri di efficacia in seguito a trattamento. Per contro i numerosissimi passaggi seriati a cui sono state sottoposte le linee cellulari utilizzate in questi modelli, hanno fatto sì che ben poco sia rimasto della similarità sia morfologica che molecolare con i tumori originari. Inoltre spesso queste linee cellulari rappresentano degli stadi avanzati della malattia, con una progressione neoplastica massiva. Per ovviare a questi problemi si è cercato

di trovare modelli alternativi che sviluppino tumori autoctoni che si avvicinino il più possibile a ciò che avviene nell'uomo.

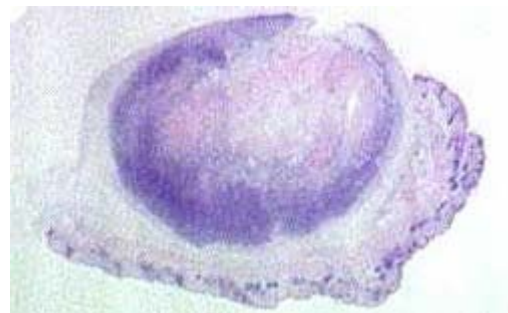


Figura 1: tumore eterologo da linea cellulare MX1 (carcinoma mammario umano) nel sottocute di un topo nudo – Ematossilina Eosina 1,5x

Tumori indotti chimicamente

Neoplasie autoctone possono essere indotte negli animali in seguito ad esposizione a diverse sostanze cancerogene, come il colon carcinoma da axoximetane (AOM) o il carcinoma al polmone da 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in topi A/J.

AOM

Nel caso dell'axoximetane, quando questo composto genotossico inoculato ripetutamente per via intraperitoneale in topi A/J, determina la comparsa dopo circa 16 settimane dei cosiddetti aberrant crypt foci, considerate le prime lesioni di natura preneoplastica a comparire nel colon dell'uomo e degli animali dove poi si svilupperanno lesioni carcinomatose.

Queste lesioni si sviluppano principalmente nella parte distale del colon, e sono evidenziabili tramite l'osservazione allo stereomicroscopio sul campione fissato in formalina e colorato con blu di metilene come cripte rilevate ed aumentate di volume.

Istologicamente queste cripte presentano vari gradi di displasia, da una semplice riduzione del numero di cellule mucipare a quadri caratterizzati da stratificazione delle cellule epiteliali, perdita di polarizzazione e basofilia.

Gli aberrant crypt foci possono progredire sino a divenire tumori, che diventano evidenti sulla mucosa del colon a partire dalla diciottesima settimana dal trattamento. I carcinomi, identificati sulla base di capacità invasiva e metastatizzante, sono decisamente rari in questo modello. In

genere le lesioni si presentano come adenomi o polipi adenomatosi, ma molto frequentemente sono presenti aspetti citologici di malignità. Solo molto raramente, però, si osserva un passaggio di cellule neoplastiche attraverso la *mucularis mucosa*, per cui la maggior parte di queste lesioni vengono classificate come carcinomi *in situ*.

Le lesioni al colon indotte da AOM mimano sia come morfologia che come distribuzione regionale le lesioni del colon-retto osservate nell'uomo. Allo stesso modo, il trattamento con AOM induce mutazioni dell'oncogene *ras* e del gene APC (Adenomatous polyposis coli) ed aumenta l'espressione della famiglia di protooncogeni *ras*, come osservato anche nei tumori del colon nell'uomo.

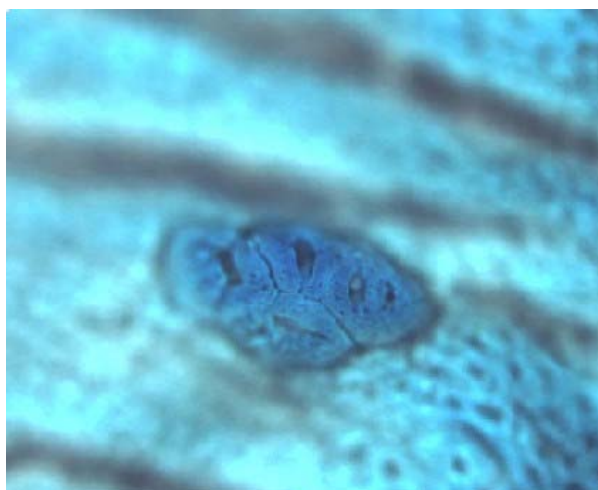


Figura 2: cripte rilevate ed aumentate di volume. Colon distale di topo A/J trattato con AOM 24 settimane prima, fissato in formalina e colorato con Blu di Metilene. 2x

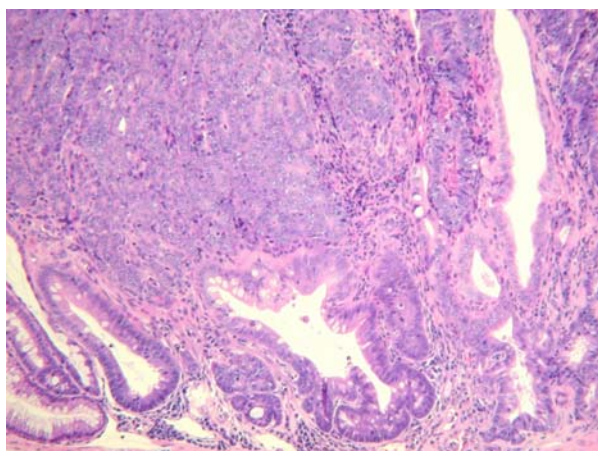


Figura 3: carcinoma *in situ*. Colon distale di topo A/J

trattato con AOM 24 settimane prima – Ematossilina Eosina 10x

NNK

L'NNK è una nitrosamina presente in grandi quantità nel fumo di tabacco, ed è considerata tra i principali stimoli che determinano lo sviluppo di adenocarcinomi polmonari nei fumatori. Anche nei topi A/J questa sostanza somministrata ripetutamente determina lo sviluppo di tumori caratterizzati da formazione di addotti della O⁶ metilguanina e da un'attivazione del protooncogene *Ki-ras*.

Macroscopicamente è possibile osservare lo sviluppo di masse nel parenchima polmonare ben visibili a fresco ed ancor più nei polmoni fissati con Bouin. Istologicamente nei polmoni di questi animali si assiste allo sviluppo progressivo di lesioni che vanno dalla semplice iperplasia sino allo sviluppo di tumori (Belinsky et al., 1992). L'iperplasia localizzata nel parenchima polmonare è caratterizzata da proliferazioni focali a margini irregolari di pneumociti di tipo II (identificati alla microscopia elettronica per la presenza dei caratteristici corpi lamellari nel citoplasma), con aspetto ben differenziato ed in assenza di atipia citoplasmatica o pleomorfismo nucleare. Lo sviluppo di adenomi all'interno di aree di iperplasia è caratterizzato dall'obliterazione di tre o più alveoli adiacenti da parte di pneumociti proliferanti. Gli adenomi sono caratterizzati da una crescita monomorfa composta da cellule ben differenziate con solo un grado minimo di pleomorfismo e minima compressione del parenchima polmonare circostante. All'interno degli adenomi frequentemente si osserva lo sviluppo di focolai caratterizzati da maggiore sdifferenziazione cellulare, sino alla formazione di carcinomi veri e propri, generalmente di tipo solido

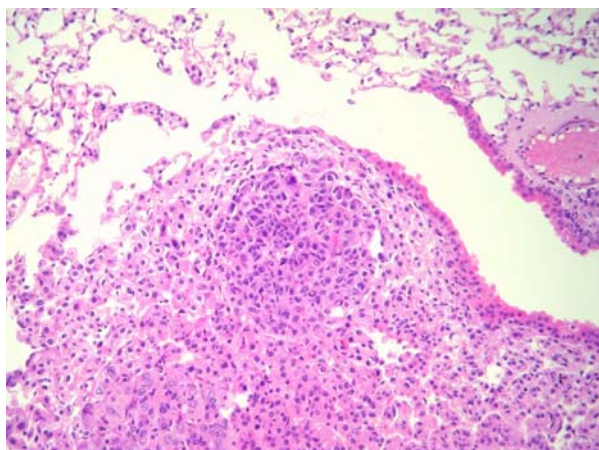


Figura 4: area di carcinoma all'interno di adenoma, caratterizzata da atipia citologica ed affollamento cellulare. Polmone di topo A/J trattato con NNK – Ematossilina Eosina 10x

Modelli transgenici

Più recentemente, il contributo della tecnologia transgenica ha permesso di aumentare notevolmente le possibilità di ricerca per l'industria farmaceutica, permettendo di creare modelli animali di tumore con un approccio ancora più mirato grazie all'inserimento di specifiche mutazioni nel genoma di topi, che permettano l'identificazione e validazione di target molecolari specifici e la valutazione preclinica di efficacia di nuovi farmaci. Sono descritti topi transgenici TRAMP ed MMTV/v-Ha-ras.

TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate)

Questi topi presentano una integrazione dell'SV40 early region regolata dal probasin promoter, espresso principalmente nelle porzioni dorsolaterali e ventrali della prostata ed in parte nelle vescicole seminali. Dalle 10 settimane di età degli animali, si osserva lo sviluppo di lesioni che vanno dalla semplice iperplasia dell'epitelio prostatico sino allo sviluppo di adenocarcinomi in grado di metastatizzare principalmente a linfonodi e polmone. In aggiunta, analogamente a quanto si osserva nell'uomo negli stadi più avanzati di neoplasia prostatica, questi tumori presentano elevati livelli di espressione della p53 e ridotta espressione di recettore per gli androgeni.

Istologicamente, in aggiunta ad adenomi, generalmente di aspetto papillare ed ad adenocarcinomi, frequentemente si può osservare

la presenza dei cosiddetti PIN (prostate intraepithelial neoplasia) considerati nell'uomo come precursori della maggior parte dei casi di carcinoma prostatico invasivo.

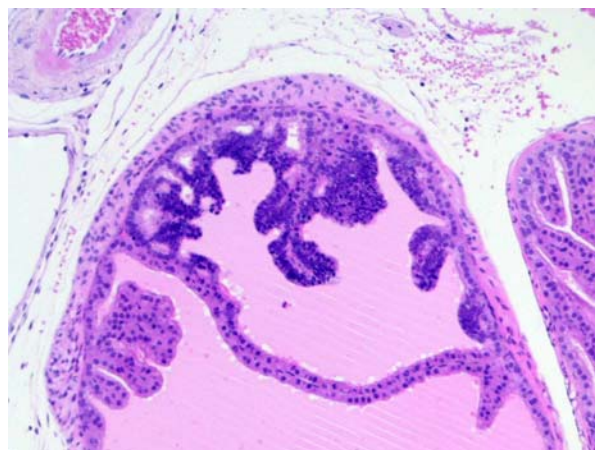


Figura 5: Area di PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) di basso grado caratterizzata da stratificazione dell'epitelio, aumentata basofilia e formazioni micropapillari. Prostata dorsale di topo transgenico TRAMP di 9 settimane. Ematossilina Eosina 10x

MMTV/v-Ha-ras

Ras è la famiglia di oncogeni più frequentemente mutato nei tumori umani. In questo modello transgenico l'oncogene ha-ras attivato è espresso nell'epitelio mammario e delle ghiandole salivari sotto il controllo del promoter MMTV. Ne risulta lo sviluppo di adenocarcinomi, principalmente a livello mammario e solo raramente nelle ghiandole salivari. Per la nomenclatura utilizzata per caratterizzare le lesioni si è fatto riferimento alle linee guida riportate da Cardiff (2000). Lesioni considerate preneoplastiche denominate MIN (Mammary Intraepithelial Neoplasia) sono costantemente presenti in tutti gli animali a partire dalle 8 settimane di età, e sono caratterizzate da vari gradi di atipia cellulare a carico di acini e tubuli. Negli animali di 12 settimane di età iniziano a comparire adenomi, mentre dalle 16 settimane di età pressochè tutti i tumori si presentano come carcinomi di aspetto solido o cribroso. Questi tumori hanno dimostrato la capacità di metastatizzare al polmone.

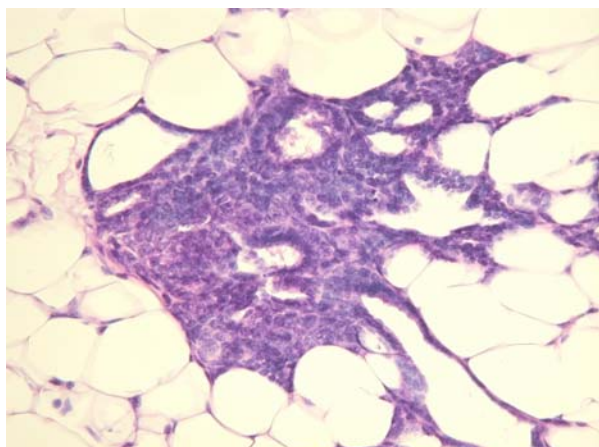


Figura 6: area di MIN (Mammary Intraepithelial Neoplasia) di alto grado nella ghiandola mammaria di topo transgenico MMTV/v-Ha-*ras* di 8 settimane – Ematossilina Eosina 20x

Conclusioni

Nonostante nessun modello animale si sia mai dimostrato pienamente predittivo della risposta terapeutica di un determinato tumore nell'uomo, allo stesso tempo siamo consci che le indicazioni

fornite da questo tipo di modelli sono di essenziale importanza per indirizzare gli oncologi clinici nel miglioramento delle terapie utilizzate nel trattamento dei pazienti.

Bibliografia

1. Belinsky S.A. *et al.* Role of the alveolar type II cell in the development and progression of pulmonary tumors induced by 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the A/J mouse. *Cancer Research* 52: 3164-3173, 1992.
2. Cardiff RD *et al.* The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* 19: 968-988, 2000.
3. Greenberg NM *et al.* Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3439-43, 1995.
4. Harrison S. Perspective in the history of tumor models. In: *Tumor models in Cancer Research*. Ed. Teicher B.A. pp. 3-19. Humana Press, Totowa, NJ, 2002.

SVILUPPO DI UNA METODICA PER LO STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA IN TESSUTI INCLUSI IN PARAFFINA MEDIANTE L'USO DEL LASER CAPTURE MICRODISSECTION

Rosaria Ferrari, Anna-Lena Frisk, Elena M. Barbaria, Andrea Terron and Axel Mahnke

NERVIANO MEDICAL SCIENCE - Viale Pasteur 10 – 20014 Nerviano (Mi) - Italy

Riassunto

Il Laser Capture Microdissection (LCM) è uno strumento relativamente recente che permette, mediante visualizzazione a livello microscopico, la selezione e l'estrazione di una determinata popolazione cellulare. L'associazione di LCM e reverse transcription PCR (RT-PCR) permette di valutare l'espressione genica in tessuti normali e patologici.

Studi precedenti hanno riportato che la qualità dell'analisi genica in tessuti congelati è migliore di quella effettuata partendo da materiale fissato in formalina e incluso in paraffina. Questi risultati non sorprendono in quanto è noto che i fissativi crosslinkanti (come le aldeidi) danneggiano la qualità del RNA e ovviamente ciò si ripercuote su successive estrazioni. Per questa ragione fino ad ora la maggior parte degli studi hanno utilizzato LCM per lo studio del RNA partendo da tessuti congelati.

Il tessuto congelato ha però lo svantaggio di una risoluzione morfologica nettamente peggiore rispetto a quella che si ottiene nel tessuto fissato. Lo scopo di questo studio è quello di sviluppare un metodo in grado di estrarre RNA da tessuto fissato e incluso. I risultati dell'analisi, in cui sono stati usati RT-PCR quantitativa e DNA chips, paragonano i risultati ottenuti da tessuti congelati e da tessuti fissati e inclusi. Tali risultati indicano che è possibile isolare RNA da sottoporre alla RT-PCR dai tessuti fissati in formalina anche se la quantità estratta non è sufficiente per una analisi qualitativa in quanto la quantità estratta resta al di sotto dei limiti di sensibilità del test.

Parole chiave: LCM, metodi, fissazione, estrazione RNA

Summary

Method development for gene expression analysis in Formalin-fixed paraffin-embedded sections employing laser capture microdissection. Laser capture microdissection (LCM) is a recently developed technique that permits the rapid and reliable procurement of pure populations of cells from tissue sections, in one step, under microscopic visualization. LCM coupled with reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) can measure gene expression in normal, neoplastic and injured tissue. The quality of amplification product obtained from frozen tissue has been reported to be higher than from paraffin wax embedded tissue. This is not surprising, since cross-linking fixatives (aldehydes) impair RNA quality and downstream processes. Thus far most studies have used LCM to detect RNA starting from frozen tissues. The disadvantage of frozen sections is a less well-preserved morphology when compared to paraffin embedded tissue.

The aim of this study was to develop a method to extract RNA from paraffin embedded tissue, fixed in 10% buffered formalin. Results of analysis, employing quantitative RT-PCR and cDNA chips, was compared between extracts from cell populations captured from paraffin and frozen tissue. Results indicated that it is possible to isolate RNA from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) samples for real-time RT-PCR analysis although the extracted RNA is not suitable for RNA quality analysis. This is likely due to the quantity of RNA obtained from FFPE samples, which is below the detection level of the assay.

Key words: LCM, methods, fixation, RNA extraction.

**LESIONI DEL MIDOLLO OSSEO CONSEGUENTI AL TRATTAMENTO CON
COMPOSTI ANTI TUMORALI**

Andrea Terron, Giusti Anna Maria

NERVIANO MEDICAL SCIENCE - Viale Pasteur 10 - 20014 Nerviano (Mi) - Italy

Riassunto

L'osservazione di variazioni significative dei parametrici ematologici durante la valutazione tossicologica di composti anti tumorali sono frequenti e complesse. Il più delle volte tali effetti sono dovuti al meccanismo d'azione farmacologico dei composti e questo è vero sia per i classici farmaci citotossici che per i farmaci di nuova generazione a target molecolare. Il midollo osseo può quindi reagire alle differenti forme di tossicità con variazioni quantitative, qualitative o determinare una risposta reattiva di tipo proliferativo. Di particolare interesse in tossicologia sono le lesioni ossee di tipo proliferativo del midollo in quanto generalmente meno comuni, difficili da valutare durante la fase sperimentale in-vivo e durante gli studi clinici ed inoltre per la similitudine con la sindrome umana della mielofibrosi midollare. La valutazione tossicologica dei composti deve quindi coinvolgere in maniera integrata i dati di ematologia, di istologia, di tossicità generale in organi e sistemi e valutare le varie differenze di razza e specie animale in termini di sensibilità. Una revisione di differenti aspetti patologici del midollo osseo osservabili durante la valutazione tossicologica di composti anti tumorali con relativo approccio interpretativo viene presentato.

Parole chiave: midollo osseo, lesioni proliferative, mielofibrosi, risposta tossica

Summary

Responses of the bone marrow to injuries induced by anticancer compounds. Hematological responses in the toxicological setting of anticancer compounds are common and quite complex. In the large majority of cases, these effects are linked to the expected mechanism of action and this is true for both classical cytotoxic drugs as well as for compounds aimed at more specific molecular targets. Bone marrow can react to the different injuries inducing quantitative abnormalities, qualitative abnormalities or reactive responses. Among reactive responses, proliferative bone lesions are of interest because less common, difficult to monitor during the in-vivo phase as well as in the clinical setting and because of the similarities with the myelofibrosis clinical syndrome. The overall safety assessment of drug induced bone marrow changes involves integration of peripheral blood data, histological data, toxicological findings in other organ systems and strain and species differences in sensitivity. An overview of various marrow changes encountered during development of anticancer drugs and a perspective on the interpretative approach will be given.

Key words: bone marrow, proliferative lesions, myelofibrosis, toxic response.

**ALTERAZIONI ENDOTELIALI INDOTTE NELLA CORTICALE DEL SURRENE
DI RATTO. STUDIO ULTRAISTRUTTURALE**

Paola Della Torre, Andrea Terron, Umberto Sammartini

NERVIANO MEDICAL SCIENCE - Viale Pasteur, 10 – 20014 Nerviano (Mi) - Italy

Riassunto

Sono riportate alterazioni endoteliali indotte dalla somministrazione di un composto antineoplastico, un inibitore di un recettore chinasi. Tali alterazioni sono state rivelate all'ultrastruttura a una dose e a un tempo tali da non essere rilevabili dal tradizionale esame istologico.

Venti ratti per gruppo sono stati assegnati ai seguenti gruppi sperimentali: gruppo 1, veicolo; gruppo 2, 15 mg/kg/die; gruppo 3, 45 mg/kg/die. Il trattamento orale è durato 14 giorni consecutivi e 5 animali per gruppo sono stati sacrificati al giorno 2, 4, 7 e 14 per valutare la comparsa e la progressione della lesione. Emorragie corticali e aree di necrosi sono state osservate istologicamente soprattutto alla dose di 45 mg/kg/die, al giorno 14.

L'esame ultrastrutturale, oltre a confermare questo dato, ha rivelato che le alterazioni endoteliali avvengono molto più precocemente. Alla dose di 45 mg/kg/die, lesioni capillari minime sono state osservate al giorno 4, esse si sono leggermente aggravate al giorno 7 diventando di grado discreto al giorno 14. A 15 mg/kg/die, lesioni minime e modeste sono state osservate al giorno 7 e 14, rispettivamente. Esse consistono in una dilatazione perivascolare, degenerazione della parete dei vasi associata nei casi più gravi a rotture dell'endotelio e fuoriuscita di emazie. Questi risultati suggeriscono che il farmaco testato induce una precoce modificazione dei capillari surrenalici e che tale lesione precede la necrosi parenchimale osservata all'istologia. La microscopia elettronica ha dimostrato di essere il metodo di elezione per la valutazione dei danni vascolari precoci.

Parole chiave: microscopia elettronica, surrenali, circolo capillare.

Summary

Induced endothelial changes in the adrenal cortex of the rat. An ultrastructural study. We

report the endothelial changes induced by the administration of a tyrosine kinase receptor inhibitor. These ultrastructural changes were observed at a dosage and timepoint of the experiment when histological examination was not able to pick up the finding. The rats were assigned randomly (20 per group) to one of the three experimental groups: group 1, vehicle; group 2, 15 mg/kg/day; group 3, 45 mg/kg/day. Rats were dosed orally for 14 consecutive days. Five animals per group were killed on days 2, 4, 7 and 14 of the study to follow the onset and progression of the lesion.

Cortical haemorrhages and necrosis had been seen by light microscopy in the adrenal glands, mainly at the dose of 45 mg/kg/day on Day 14. Transmission electron microscopy confirmed this finding but also revealed that the vascular changes occurred earlier. In particular, it revealed minimal microvascular changes on Day 4 at the dose of 45 mg/kg; the severity of the lesion increased on Day 7, becoming moderate on Day 14. At the dose of 15 mg/kg/day minimal and slight lesions were seen on Days 7 and 14, respectively. The changes observed in the microvasculature were ultrastructurally characterized by perivasculature dilation and vascular degeneration, associated in the most severe cases with endothelial rupture and erythrocyte extravasation. Results suggest that the tested new drug induces an early impairment of the capillary microvasculature in the adrenals and that the capillary lesions precede the parenchymal necrosis seen at histology. Electron microscopy proved to be the method of choice for detecting early vascular changes.

Key words: electron microscopy, adrenal, capillary microvasculature

Introduzione

La caratterizzazione morfologica dei cambiamenti tossicologici indotti dalla somministrazione di nuove entità chimiche è una parte fondamentale

della caratterizzazione tossicologica, sia negli studi investigativi sia in quelli regolatori. Talvolta è difficile individuare i cambiamenti morfologici iniziali, soprattutto se i composti sono somministrati tramite dosaggio multiplo, se la comparsa della lesione è rapida o quando la severità del quadro istologico è tale da rendere invisibile la lesione precoce. Questo è particolarmente vero quando la struttura di target tossicologico è l'endotelio. Le alterazioni patologiche a livello dei capillari possono indurre potenzialmente un quadro morfologico drammatico, con emorragie massive ed estese aree di necrosi nella struttura parenchimale. Con l'utilizzo della microscopia luce tradizionale alcune alterazioni precoci dell'endotelio potrebbero passare inosservate. Con l'esame ultrastrutturale, usando la microscopia elettronica a trasmissione, è possibile invece abbassare la soglia di sensibilità di analisi, permettendo di stabilire in modo più corretto quale sia il livello di dose senza effetti tossici.

Questo lavoro, che descrive gli effetti tossici indotti nella corticale surrenalica da un composto antineoplastico, dimostra l'utilità dell'applicazione della microscopia elettronica in tossicologia, per la evidenziazione di lesioni endoteliali precoci.

Materiali e metodi

La sperimentazione animale è stata condotta in stretta conformità con le linee guida europee ed italiane per la salute e il benessere degli animali di laboratorio.

Venti ratti maschi per gruppo sono stati assegnati a caso a tre dei seguenti gruppi sperimentali: gruppo 1, veicolo; gruppo 2, 15 mg/kg/die; gruppo 3, 45 mg/kg/die. Gli animali sono stati trattati oralmente per 14 giorni consecutivi con un composto antineoplastico, un inibitore di un recettore chinasi. Per seguire la comparsa e la progressione della lesione cinque animali per gruppo sono stati sacrificati al giorno 2, 4, 7 e 14. Per l'esame istologico, eseguito sui surreni di tutti gli animali, i campioni sono stati processati e inclusi in paraffina e le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina. Per la microscopia elettronica a trasmissione, i campioni di surrene sono stati prelevati da un controllo e da 4/5 ratti trattati con 15 e 45 mg/kg/die e sacrificati ai tempi

previsti. I campioni sono stati fissati in liquido di Karnovsky, post fissati in una soluzione di osmio all'1% , disidratati e in seguito inclusi in una miscela di epon e araldite. Sezioni semifini di circa 1 micron sono state tagliate, colorate con blu di toluidina ed esaminate istologicamente per identificare l'area di interesse del surrene, cioè la zona fascicolata. Sezioni ultrafini di colore oro/argento, caricate su retini di rame, sono state in seguito contrastate con una soluzione di acetato di uranile e di citrato di piombo. L'esame ultrastrutturale, limitato ad uno o due campioni per gruppo ad ogni scadenza di sacrificio, è stato effettuato con il microscopio elettronico a trasmissione Philips CM10.

Risultati

La microscopia luce ha evidenziato nelle ghiandole surrenaliche estese aree emorragiche e necrotiche a carico della corticale soprattutto alla dose di 45 mg/kg, al giorno 14 (fig.1).

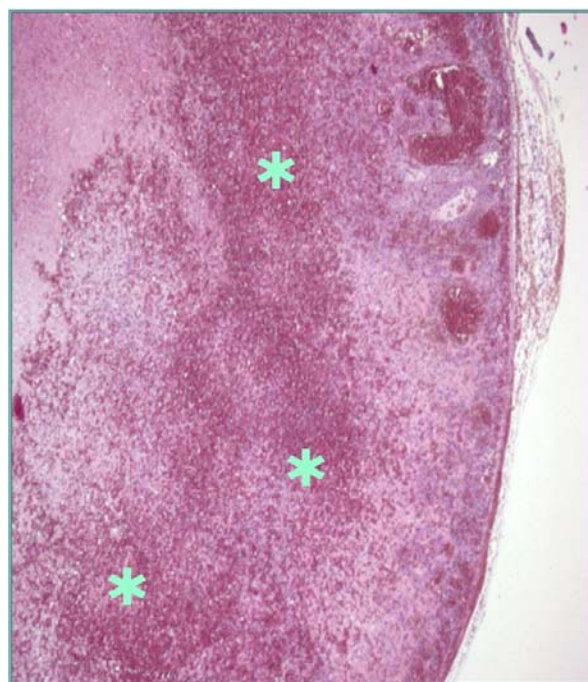


Figura 1. Necrosi emorragica diffusa (asterisco) a carico della corticale surrenalica dopo trattamento di 14 giorni alla dose di 45 mg/kg/die (E&E; 10X)

La microscopia elettronica, inizialmente effettuata su campioni di zona fascicolata provenienti da animali trattati con 45 mg/kg/die e sacrificati al quattordicesimo giorno, oltre a confermare il danno a carico delle cellule parenchimali, ha

rivelato un danneggiamento dei capillari costituito da dilatazioni perivascolari, degenerazioni endoteliali associate a rotture dell'endotelio e fuoriuscita di globuli rossi (figura 2).



Figura 2. Aree emorragiche caratterizzate da alterazioni dell'endotelio, presenza di eritrociti impaccati in sede extravasale (asterisco) e ammassi di fibrina intra e extravasale (freccia) dopo trattamento di 14 settimane alla dose di 45 mg/kg/die (acetato di uranile&citrato di piombo; 1650X)

Per valutare in modo più approfondito le alterazioni vascolari, si è deciso di estendere l'esame ultrastrutturale ai campioni di animali trattati con 15 mg/kg/die e sacrificati al giorno 14 ed ai campioni trattati con entrambe le dosi e sacrificati nei giorni 2, 4 e 7. La tabella 1, che riporta la frequenza e il grado di severità delle alterazioni riscontrate all'ultrastruttura, indica che le lesioni, per quanto concerne il grado di severità, sono tempo e dose correlate. Le alterazioni compaiono dal giorno 4 alla dose di 45 mg/kg/die e dal giorno 7 alla dose più bassa di 15 mg/kg/die. Le figure 3, 4 e 5, che mettono a confronto l'aspetto ultrastrutturale dei capillari corticali in un animale di controllo e in un trattato, mostrano le caratteristiche più significative delle lesioni vascolari consistenti in una dilatazione degli spazi perivascolari, una degenerazione endoteliale

associata nei casi più gravi a rotture dell'endotelio e ad obliterazioni dei lumi capillari.

Aree di cellule parenchimali degenerate/necrotiche, corrispondenti a quelle osservate all'esame istologico, sono state osservate ultrastrutturalmente alla dose di 45 mg/kg/die, al giorno 14; alla stessa dose al giorno 7 e alla dose di 15 mg/kg/die al giorno 14 erano visibili all'ultrastruttura occasionali cellule degenerate o necrotiche.

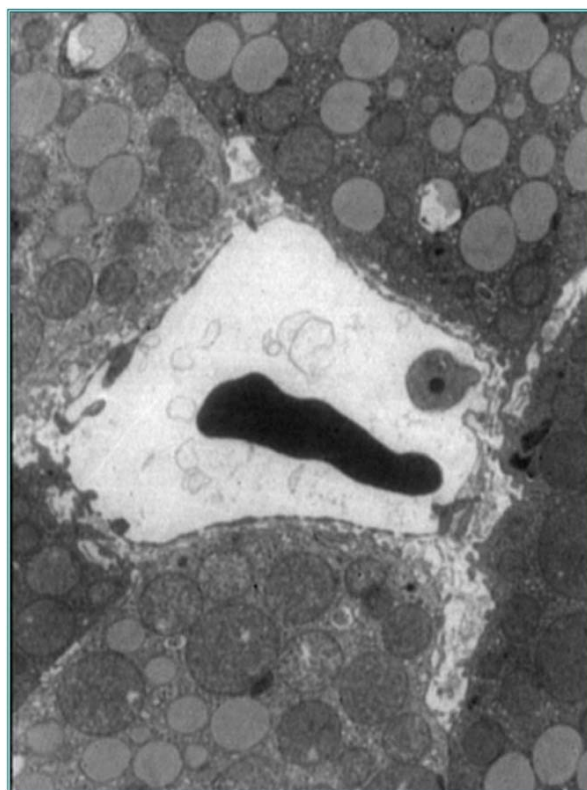


Figura 3. Aspetto normale di un capillare surrenalico osservato in un animale di controllo. Le cellule parenchimali delimitano strettamente il capillare nel quale è ben visibile lo strato endoteliale (acetato di uranile&citrato di piombo; 1950X)

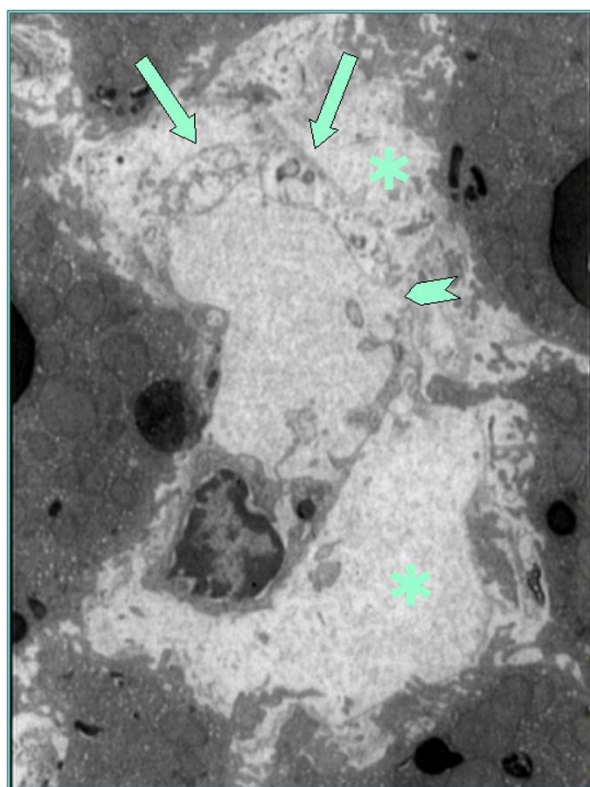


Figura 4. Marcata dilatazione dello spazio perivascolare (asterisco), degenerazione dello strato endoteliale caratterizzato da rigonfiamento

e rarefazione citoplasmatica (freccia) e rotture dello strato endoteliale (testa di freccia) dopo trattamento di 7 giorni con la dose di 45 mg/kg (acetato di uranile&citrato di piombo; 1950X)

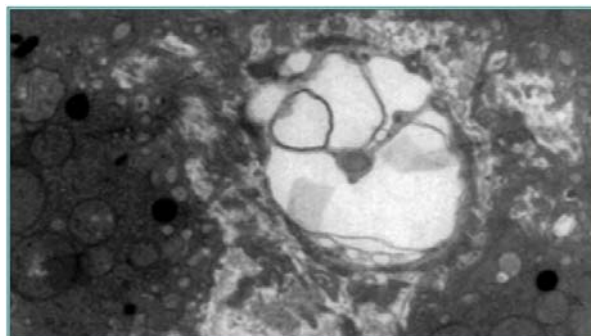


Figura 5. Marcata alterazione endoteliale a carico di un capillare non più funzionante, osservata dopo 7 giorni di trattamento con la dose di 45 mg/kg. Il lume del capillare è completamente obliterato dal rigonfiamento endoteliale che porta alla formazione di bolle citoplasmatiche (acetato di uranile&citrato di piombo; 1950X)

Dosaggio (mg/kg/die)	Giorno 2			Giorno 4			Giorno 7			Giorno 14		
	0	15	45	0	15	45	0	15	45	0	15	45
• Nei limiti della norma	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1		1/1	1/2		1/1		
• Minima alterazione ai capillari (Caratterizzata da dilatazione perivascolare e degenerazione endoteliale)						1/1		1/2				
• Modesta alterazione ai capillari (Caratterizzata da dilatazione perivascolare, degenerazione endoteliale e rotture dello strato endoteliale)									2/2		1/1	
• Occasionali cellule parenchimali degenerate/necrotiche									2/2		1/1	
• Discreta alterazione ai capillari (Caratterizzata da dilatazione perivascolare, degenerazione endoteliale, rotture dello strato endoteliale e stravasato di eritrociti)												2/2
• Aree di cellule parenchimali degenerate/necrotiche												2/2

Tabella 1. Grado di severità e incidenza delle alterazioni ultrastrutturali rilevate nella corticale surrenalica

Discussione

Il nuovo farmaco antineoplastico testato ha indotto una notevole tossicità surrenalica caratterizzata da una severa necrosi emorragica corticale. Tale reperto è stato osservato istologicamente dopo 14 giorni di trattamento, alla dose alta di 45 mg/kg/die. L'indagine ultrastrutturale non solo ha confermato questo reperto ma ha permesso di evidenziare alterazioni vascolari che si manifestano molto precocemente. Infatti, poiché in questo studio sono stati effettuati dei sacrifici scaglionati, la microscopia elettronica ha permesso di seguire la comparsa e l'evolversi delle alterazioni vascolari nel tempo. In particolare, sono state osservate minime alterazioni vascolari al giorno 4 alla dose di 45mg/kg/die; tali lesioni aumentavano di intensità al giorno 7, raggiungendo al giorno 14 un grado di severità discreto. Anche alla dose bassa di 15 mg/kg/die sono state osservate lesioni ai capillari, di grado minimo al giorno 7 e modesto al giorno 14. A carico delle cellule parenchimali della zona fasciolata sono stati talora osservati aspetti degenerativi e necrotici; essi erano particolarmente evidenti dopo 14 giorni di trattamento con la dose di 45 mg/kg/die. E' interessante notare che le alterazioni vascolari più

precoci e di entità minima osservate dopo 4 giorni di trattamento con la dose alta, non erano associate ad alcuna degenerazione a carico delle cellule parenchimali.

Questi risultati suggeriscono che il nuovo farmaco testato è in grado di indurre un danno assai precoce a carico dei capillari surrenalici e che il danno vascolare precede il danno a carico delle cellule parenchimali. Queste alterazioni sono state osservate ad una dose e ad un tempo di sacrificio nei quali l'esame istologico non è stato in grado di evidenziare alcuna lesione. Solo tramite l'analisi ultrastrutturale è stato possibile riconoscere nella cellula endoteliale il target primario della tossicità del nuovo farmaco testato.

Conclusioni

Sulla base dei reperti ultrastrutturali è stato possibile dimostrare che il nuovo farmaco antineoplastico testato è in grado di indurre un danno precoce ai capillari della corticale surrenalica e che la lesione a carico dei capillari precede quella a carico delle cellule parenchimali. La microscopia elettronica a trasmissione è risultata essere il metodo di elezione per rivelare danni vascolari precoci.

***LESIONI NUCLEARI IN EPATOCITI DI PRIMATE NON UMANO
(CYNOMOLGUS MONKEY) CON DIABETE SPONTANEO***

Klapwijk C. Jan, Terron Andrea, Steidler Stephanie

NERVIANO MEDICAL SCIENCE - Viale Pasteur 10 - 20014 Nerviano (Mi) - Italy

Riassunto

Una femmina adulta (9 anni) di *Cynomolgus monkey*, non appartenente a studi tossicologici, presentava all'esame anamnestico una evidente perdita di peso negli ultimi tre mesi. L'appetito dell'animale restava buono e non vi erano altre segnalazioni sintomatologiche. All'esame chimico clinico era presente una evidente iperglicemia (710 mg/dL; range di laboratorio:45-88 mg/dL) e un marcato aumento dei trigliceridi (941 mg/dL; range di laboratorio 28-79 mg/dL). Altre variazioni biochimiche furono osservate nei livelli di colesterolo totale, enzimi epatici ed urea. A livello ematologico era presente una linfopenia significativa. A causa delle precarie condizioni l'animale fu sacrificato. All'esame necroscopico fu osservata una scomparsa delle riserve di grasso corporeo, la presenza di aree scure a livello polmonare con presenza di materiale purulento all'interno dei grossi bronchi. Istologicamente, lesioni patologiche furono evidenziate in diversi organi e descritte come amiloidosi delle isole endocrine del pancreas, broncopolmonite e vacuolizzazione delle cellule renali tubulari. Nel fegato, i nuclei delle cellule epatiche corrispondenti alla zona 1 erano dilatati e contenenti un evidente vacuolo vuoto. Tali nuclei erano simili a quelli descritti in casi di diabete umano o di obesità e descritti come "glycogen nuclei". La diagnosi primaria proposta è un diabete mellito spontaneo con amiloidosi delle isole endocrine pancreatiche.

Parole chiave: scimmia, diabete, fegato

Summary

Hepatic glycogen nuclei in a *Cynomolgus monkey* with spontaneous diabetes mellitus. A 9-year old female *Cynomolgus monkey* not currently on study presented with a history of weight loss over the previous 3 months. The animal's appetite remained good. The most

significant clinical chemistry finding was a marked hyperglycemia and hypertriglyceridemia. Because of continuing weight loss the animal was euthanased.

At necropsy severe wasting was evident with an almost complete absence of body fat. Unilateral darkening of the lungs was observed with purulent material in the major airways. Other thoracic and abdominal organs appeared normal.

Histopathology revealed changes in a number of organs: severe pancreatic insular amyloidosis, bronchopneumonia and renal tubular vacuolation. In addition, in the liver, nuclei in zone 1 were distended by single, large, discrete, generally empty vacuoles. These were similar to the so-called "glycogen nuclei" described in human cases of diabetes and/or obesity.

A primary diagnosis of spontaneous diabetes mellitus due to insular amyloidosis was made.

Key words: monkey, diabetes, liver, intranuclear inclusions.

Introduction

Amyloidosis is a recognised group of conditions in non-human primates, including macaques¹. Both focal and multifocal deposition of amyloid proteins can occur. However, whilst pancreatic islet amyloidosis is common in humans (and cats) with diabetes mellitus, it has not been frequently described in non-human primates². In the case we report here amyloid was demonstrable only in the pancreatic islets and was associated with persistent hyperglycemia over many months.

A number of intranuclear and cytoplasmic inclusions have been described in hepatocytes of several species, including humans³. They can be associated with a number of spontaneous, experimental or iatrogenic conditions, though often their origin remains obscure. In the present case pale hepatocellular intranuclear inclusions were compared to those occasionally described in humans with a number of conditions, including

diabetes mellitus and termed “glycogen nuclei”. The possibility of these inclusions being an artefact are also considered.

Materials and methods

The monkey was a 9-year old female *Cynomolgus* originating from Charles River Primate Laboratory, Mauritius and had been in our small colony for a number of years. It had previously been used in a toxicokinetic study, but the pharmaceutical it had received was not considered to have any influence on the subsequent development of pancreatic amyloidosis.

It was singly housed in a stainless steel cage, in a room containing other female *Cynomolgus* monkeys and fed a regular laboratory chow, supplemented with fruit or vegetables. Drinking water was from the municipal mains supply and given ad-lib from water bottles. Environmental, housing and experimental procedures were in compliance with EEC and Italian Guidelines for Laboratory Animal Welfare.

Clinical chemistry and hematology analysis was performed in-house using a Hitachi 917 and a Bayer Advia 120 analyser respectively.

A complete necropsy was performed; tissues selected for histopathological examination were fixed in 10% normal buffered formalin. Tissues were processed into wax blocks and sectioned prior to staining with either Hematoxylin and Eosin (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS) or Congo Red. For H&E and PAS staining sections were cut at a thickness of 4µm; for Congo Red a thickness of 10µm was used. Tissues examined were heart, aorta, lungs, liver, pancreas, kidneys, urinary bladder, spleen, stomach, duodenum, uterus and ovaries.

Results

In January 2004 the animal presented with a history of weight loss over the previous 3 months. The animal’s appetite remained good and no other symptoms were reported. Apart from obvious wasting, there were no other signs evident upon clinical examination. A blood sample was taken for clinical pathology analysis (see Table 1).

The most significant clinical chemistry finding was a marked hyperglycemia (710 mg/dL; laboratory range: 45 – 88 mg/dL) and hypertriglyceridemia (941 mg/dL; laboratory

range: 28 – 79 mg/dL). Other, less dramatic, changes were seen in plasma concentrations of total cholesterol, liver enzymes and urea. In addition, a significant lymphopenia was present (0.55 x 10³/µL; laboratory range 2.5 – 7.8 x 10³/µL). Retrospective examination of previous routine clinical chemistry analysis performed over the previous 12 months revealed a persistent and increasing hyperglycemia (Table 1). A clinical diagnosis of diabetes mellitus was made. Because of these findings and continuing weight loss the animal was euthanased.

At necropsy severe wasting was evident with an almost complete absence of body fat. Unilateral darkening of the lungs was observed with purulent material in the major airways. Other thoracic and abdominal organs appeared normal. Histological examination showed severe changes in pancreatic islets, with marked reduction in cellularity and replacement by amorphous, eosinophilic material (fig.1). This material was moderately positive with Congo Red and showed apple-green birefringence under polarised light (fig. 2). Over 90% of islets were affected. A diagnosis of severe pancreatic insular amyloidosis was made.

In the liver, hepatocellular nuclei in zone 1 were distended by single, large, discrete, generally empty vacuoles (figs. 3 and 4). PAS staining showed occasional PAS positive granules within the vacuoles (Fig. 5). Other findings considered incidental were acute bronchopneumonia and renal tubular vacuolation.

Parameter	Normal range	December 2002	June 2003	January 2004
Glucose (mg/dl)	45 – 88	154	345	710
Triglycerides (mg/dl)	28 – 79	166	1403	941
Cholesterol (mg/dl)	90 – 147	121	296	176
ALT (U/l)	29 – 87	71	54	267
AST (U/l)	26 – 97	40	77	144
LDH (U/l)	917 – 1461	800	2027	1991
Albumin (g/dl)	3.8 - 4.9	3.9	3.8	3.2
Globulin (g/dl)	2.8 - 3.9	3.5	4.3	4.0
Urea (mg/dl)	25 - 54	49	36	147

Table 1: Significant clinical chemistry parameters (December 2002 to January 2004).

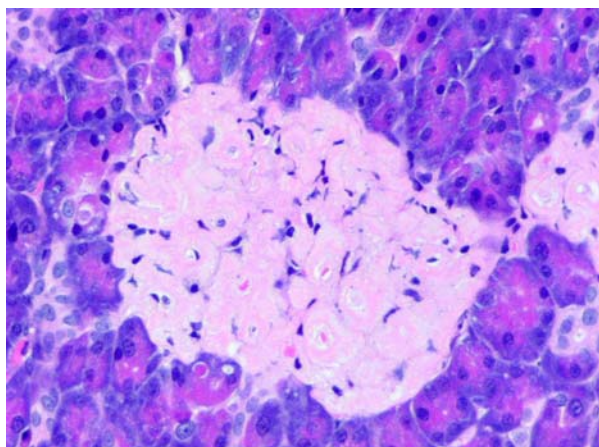


Figure 1. Pancreatic Islet (H&E) showing replacement with amorphous, eosinophilic material.

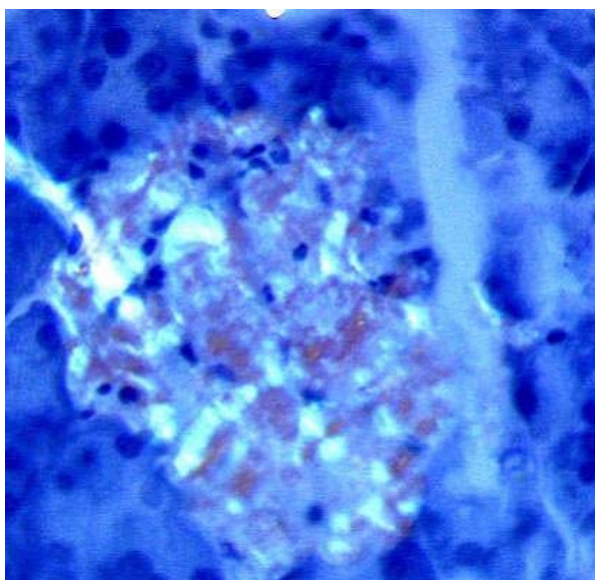


Figure 2. Pancreatic Islet (Congo Red) showing birefringence under polarised light.

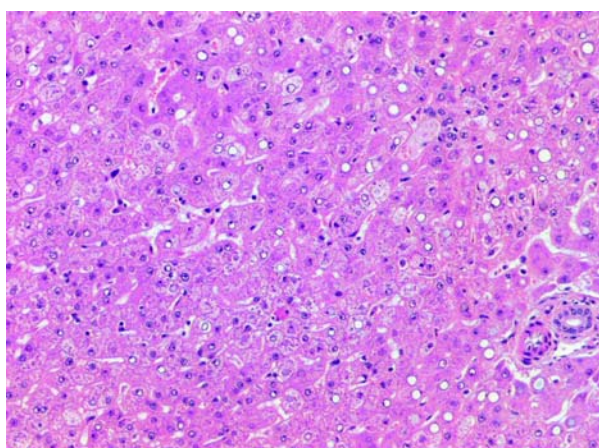


Figure 3. Liver (H&E) showing periportal nuclear vacuolation.

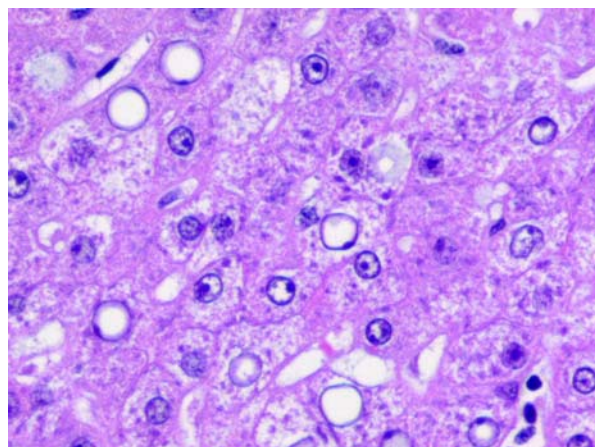


Figure 4. Higher power of figure 3, showing predominantly empty nuclear vacuoles.

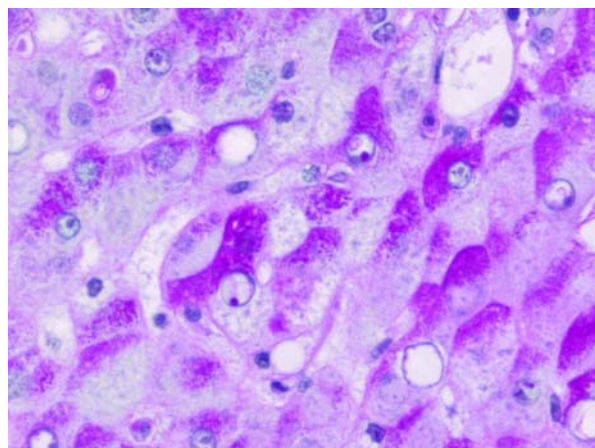


Figure 5. PAS stain showing occasional PAS positive intra-nuclear material.

Discussion

A primary diagnosis of spontaneous diabetes mellitus due to insular amyloidosis was made. Clinical chemistry evidence shows that this had likely been developing over the previous year before becoming clinically apparent. The severity of the islet cell changes is consistent with this timescale. Amyloidosis can be secondary to an inflammatory condition. Whilst inflammation was present in this animal, in the form of bronchopneumonia, it was considered too acute to have been a likely initiating factor. In addition, amyloidosis was detected only in the pancreas, whereas a multifocal distribution would be more likely if it was secondary to an inflammatory lesion.

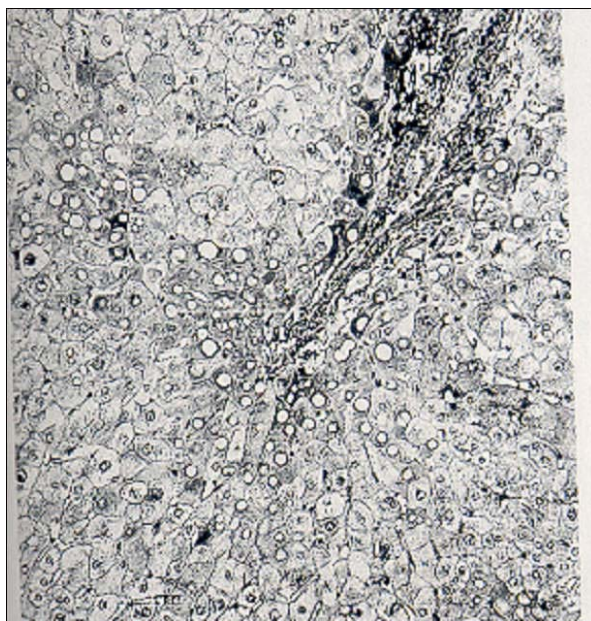


Figure 6. Example of glycogen nuclei in zone 1 hepatocytes in human with Wilson's disease (from ref. 7).

The intranuclear vacuoles seen here were similar to the so-called "glycogen nuclei" described in human cases of diabetes and/or obesity⁴⁻⁸. They are intra-nuclear and have a predominantly periportal distribution as in this case (Fig. 6). In humans they have also been associated with cystic fibrosis, Wilson's diseases and cholelithiasis (or its treatment). We also considered the possibility of these vacuoles being a post-mortem artefact. For instance, Li et al described hepatocellular vacuoles as a consequence of delayed fixation of tissues in rats. However, the vacuoles they reported were predominantly intracytoplasmic. In addition, in our case there was little delayed between euthanasia and fixation of tissues (no significant autolysis was present in the intestine, for example). Therefore, we did not consider the vacuoles in this case to be an artefact.

Conclusion

We conclude that this is a case of spontaneous diabetes mellitus secondary to idiopathic pancreatic islet amyloidosis. The changes observed in hepatocytes were considered to be "glycogen nuclei" similar to those described in human cases of diabetes.

References

1. Anon. (2003). Diagnosis: Amyloidosis. *Lab Animal*. 32(6): 1-4
2. Hubbard et al (2002). Spontaneous pancreatic islet amyloidosis in 40 baboons. *J Med Primatol* 31: 84-90
3. van Zwieten & Hollander (1997). Intranuclear and intracytoplasmic inclusions, liver, rat *in* Monographs on pathology of laboratory animals: Digestive System (2nd Edition); Editors: Jones, Popp & Mohr; 133-8; Springer, Berlin.
4. Abraham & Furth (1994) Receiver operating characteristics of glycogenated nuclei in liver biopsy specimens: quantitative evaluation of their relationship with diabetes and obesity. *Hum Pathol* 25(10): 1063-8
5. Fisher et al (1982) A prospective morphologic evaluation of hepatic toxicity of chenodeoxycholic acid in patients with cholelithiasis: the National Cooperative Gallstone Study. *Hepatology* 2(2): 187-201
6. Hulcrantz et al (1986). Morphological findings in the liver of children with cystic fibrosis: a light and electron microscopical study. *Hepatology* 6(5): 881-9
7. Ishak & Markin (1996). The Liver *in* Anderson's Pathology; 10th Edⁿ. Eds. Damjanov & Linder; Mosby, St. Louis
8. Silverman et al (1990). Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 85(10): 1349-55
9. Li et al (2003) Morphogenesis of postmortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in Sprague-Dawley rats. *Tox Path.* 31: 682-688

***THE VALUE OF BONE MARROW ANALYSIS IN THE DIFFERENTIAL
DIAGNOSIS OF ANAEMIAS***

Archer Joy

Queen's Veterinary School. University of Cambridge. U.K.

When moderate to marked anaemia continues to be non regenerative after an adequate interval (3 - 5 days in general) bone marrow analysis may be indicated. If bone marrow analysis is undertaken it is best to obtain blood for CBC and film analysis, bone marrow aspirate for cytology (morphology) and a core biopsy for histology (cellularity) within a short time interval. Ideally all three should be analyzed together and by the same individual. If this is not possible then the haematology/ cytology should be interpreted in conjunction with the histology report and histopathologist if practical.

Anaemias of chronic disease are usually normocytic and normochromic and of mild to moderate severity. In many cases the cause of the chronic disease can be identified by haematology ,biochemistry and microbiology tests. Renal disease is a common cause, and levels of erythropoietin could be measured, but usually these are low and stimulus to erythropoiesis in the bone marrow is reduced leading to the chronic anaemia. Anaemias of inflammatory disease are frequently accompanied by a leucocytosis (inflammatory response). This would be reflected in the bone marrow by increased leucopoiesis and an increased M:E ratio with possible increased iron stores and sequestration. In anaemias associated with viral disease (e.g FeLV, parvo), PCR analysis can be performed on bone marrow where the virus may be sequestered. Anaemias associated with parasites may be haemolytic , severe and regenerative, preregenerative or less commonly non regenerative. In some of these, bone marrow analysis particularly cytology may be very helpful. In histoplasma organisms can often be found in bone marrow aspirates. In

Leishmania bone marrow often contains increased numbers of macrophages and organisms can also be found. With Ehrlichia and Toxoplasma, organisms are less commonly found. If the cause of the anaemia is red cell aplasia, bone marrow core and aspirate are indicated. Underlying conditions such as myelofibrosis, fat deposition and necrosis can only be definitively diagnosed on histology of an adequate core biopsy. Aplasia due to drug toxicity can be determined by a treatment history, discontinuation of the therapy and supportive care (e.g blood transfusion) until the haematopoietic progenitor cells recover. In immune mediated haemolytic anaemias which are persistently non regenerative bone marrow analysis may indicate that the target cells are those usually not entering the peripheral circulation.

If haematopoietic neoplasia is diagnosed by the presence of abnormal cells in the peripheral blood, bone marrow aspirate cytology will provide a morphological diagnosis of abnormal cell type. This can be further confirmed by immunophenotyping (FACS analysis) of blood and bone marrow aspirates or immunohistochemistry of core biopsy sections. Other neoplasms which may infiltrate the bone marrow and suppress erythropoiesis by producing specific factors and /or displacement of normal haematopoietic cells can be identified and the degree of infiltration estimated best by core biopsy histology.

Complete bone marrow analysis is a valuable tool in both diagnosis and monitoring of many different types of anaemia.

COLORAZIONE DI OIL-RED-O NELLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA DEL LIPOSARCOMA DEL CANE

Masserdotti Carlo

LABORATORIO BIODIVERSITY – DIVISIONE VETERINARIA
via Corfù n°71, 25124 Brescia

Riassunto

Quattro neoformazioni sottocutanee provenienti da altrettanti soggetti di specie canina sono state sottoposte ad aspirazione con ago sottile (FNA). I campioni citologici provenienti da ciascuna lesione sono stati allestiti su vetrino e fissati all'aria; per ciascuna neoformazione un'aliquota di allestimenti è stata sottoposta a colorazione con metodo di May-Grünwald Giemsa e ad indagini citologica. Tutti i campioni erano caratterizzati da fondo lievemente detritico ed occupato da moderato quantitativo di materiale di aspetto lipidico in goccioline acromatiche e dall'esfoliazione di abbondante cellularità, rappresentata da elementi fusati, monocaudati od ovoidali a citoplasma debolmente basofilo frequentemente occupato da vacuolizzazioni rotonde a margini netti e di calibro variabile, recanti nuclei dismetrici a profilo irregolarmente ovoidale o rotondeggiante, a cromatina irregolare, frequentemente nucleolati. In tre dei quattro casi è stato possibile osservare disposizioni perivascolari degli elementi neoplastici. Una seconda aliquota di allestimenti per ciascun campione è stata sottoposta a colorazione di Oil-Red-O, nel tentativo di dimostrare la natura lipidica delle vacuolizzazioni. Tutti i campioni sono risultati positivi alla colorazione, la cui specificità era rappresentata dal cromatismo rosso-aranciato delle vacuolizzazioni intracitoplasmatiche ed extracellulari.

L'esecuzione della colorazione di Oil-Red-O è indicata nella dimostrazione della natura lipidica del materiale vacuolare ed ha manifestato notevole utilità nell'applicazione su materiale cellulare proveniente da prelievi con ago sottile; i lipidi del campione citologico fissato a secco sono conservati dalla fissazione all'aria, mentre, su

campioni istologici, essi vengono invece solubilizzati e persi per effetto della processazione.

Parole Chiave: cane, liposarcoma, Oil-Red-O.

Summary

Oil-red-o stain in diagnostic cytology of canine liposarcoma. Four canine subcutaneous tumors were submitted to fine-needle aspiration (FNA). Cytologic collection of neoplastic material from each lesion was spread on glass microscope slide and air-dried; for each lesion some slides were stained with May-Grünwald Giemsa method. All samples showed slightly detritic background, moderate amount of scattered droplets of lipidic material and high cellularity, represented by spindle or ovoid cells, with small to large round vacuolation in basophilic cytoplasm and dismetric, round or ovoid-shaped nuclei, with irregular clumped chromatin and nucleoli. In three of four cases it was possible to observe the presence of perivascular arrangements of the neoplastic cells. Other slides were submitted to Oil-Red-O stain, in order to demonstrate the lipidic nature of vacuolation. All samples resulted positive to the stain, showing red-orange colour of intracytoplasmic and extracellular vacuolation. Oil-Red-O stain in diagnostic cytology represents a useful tool in demonstration of lipidic origin of vacuolated material and showed good applicability on cells from fine-needle collection; lipids of air-dried cytologic smears are well preserved, while, on histologic section, they are solubilized and lost during preparation.

Keywords: dog, liposarcoma, Oil-Red-O.

**INDAGINI SUL RUOLO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO DELLA
MISURAZIONE DI ALCUNE PROTEINE DI FASE ACUTA NEL SANGUE DI
CANI CON LEUCOCITOSI**

Spiranelli Eleonora*, Bonfanti Ugo, Ceron José Joaquin***, Paltrinieri Saverio***

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

**Clinica Veterinaria Gran Sasso, Milano

*** Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary School, University of Murcia (Spain)

Riassunto

Le proteine di fase acuta (APPs) aumentano (APPs positive) o diminuiscono (APPs negative) in corso di flogosi. In medicina umana vengono utilizzate come strumento diagnostico, prognostico e per monitorare le risposte alle terapie. Variazioni della concentrazione ematica delle APPs possono riscontrarsi anche in corso di neoplasia. Al contrario, anche forme non infiammatorie possono indurre alterazioni simil-flogistiche come la leucocitosi. Abbiamo quindi voluto verificare se la concentrazione ematica delle APPs possa avere un ruolo diagnostico e prognostico in cani con leucocitosi infiammatoria. A tale scopo abbiamo prelevato campioni di sangue da 10 cani sani e da cani con leucocitosi indotte da flogosi (N=12), leucemiche (N=6) e reattive non infiammatorie (N=9). Su tali campioni sono state valutate le proteine totali (metodo al biureto), le albumine (determinazione elettroforetica) e le APPs siero amiloide A o SAA, proteina C reattiva o CRP (metodo ELISA) e aptoglobina o Hp (metodo colorimetrico). I risultati hanno evidenziato, oltre ad un'elevata variabilità individuale non sempre correlabile al tipo di patologia, un aumento di CRP e, in minor misura, di SAA in cani con flogosi. La diminuzione delle albumine e l'aumento della SAA sono anche caratterizzati da un elevato valore predittivo negativo. Ciò significa che l'assenza di variazioni di tali proteine in cani con leucocitosi dovrebbe escludere il sospetto diagnostico di flogosi. L'analisi di alcuni prelievi ripetuti ha permesso di rilevare che, a dispetto della transitoria normalizzazione dei quadri clinici ed ematologici, le alterazioni delle APPs sono costanti nei cani successivamente deceduti, attribuendo così alla determinazione di tali proteine un forte ruolo prognostico.

Parole chiave: infiammazione, leucocitosi, proteine di fase acuta, diagnosi, prognosi.

Summary

Investigations on the diagnostic and prognostic role of acute phase protein measurement in blood from dogs with leukocytosis. Acute Phase Proteins (APPs) increase (positive APPs) or decrease (negative APPs) during inflammation. In humans, APPs have a high diagnostic and prognostic value and are also used for treatment monitoring. Changes of APPs levels can be found also during tumours and, on the contrary, non-inflammatory conditions can show inflammatory-like changes such as leukocytosis. We have thus investigated the possible diagnostic and prognostic role of APPs measurement in dog with inflammation. To this aim we collected blood samples from 10 healthy dogs and from dogs with leukocytosis due to inflammation (N=12), leukemia (N=6) and non-inflammatory reactions (N=9). On these samples we measured total protein (biuret method), albumin (electrophoresis) and the levels of some APPs such as serum amyloid A or SAA, C reactive protein or CRP (ELISA method), and haptoglobin or Hp (colorimetric method). The results demonstrated a high individual variation, unrelated to the underlying disease. Nevertheless, dogs with inflammation had increased CRP and, to a lesser extent, SAA levels. Decreased albumin and increased SAA levels had a high negative predictive values, thus suggesting that when dogs with leukocytosis have a normal serum concentration of these proteins, inflammation might be excluded from the differential diagnosis. The analysis of some repeated sampling showed that dogs that died during the follow up had persistent changes of APPs in spite of a transient improvement of clinical and hematological signs. Based on this finding, APPs measurement also have a good prognostic role.

Key Words: inflammation, leukocytosis, acute phase protein, diagnosis, prognosis.

Introduzione

Con il termine leucocitosi si intende l'aumento del numero di globuli bianchi circolanti, che nel cane sono considerati fisiologici in valori compresi tra 6000 e 17000 cellule/ μ l. Ciò si verifica in genere in corso di forme infiammatorie, ma esistono anche leucocitosi reattive non infiammatorie; è inoltre rilevabile leucocitosi anche in corso di leucemia, ossia di una neoplasia maligna a carico delle cellule ematopoietiche del midollo osseo, che viene gradualmente sostituito da un clone neoplastico, spesso rinvenibile anche in circolo (1).

Scopo del presente lavoro è quello di identificare dei parametri aggiuntivi che possano essere usati nella diagnosi differenziale di leucocitosi di diversa natura. A tal fine si è inteso indagare l'utilizzo delle proteine di fase acuta (APPs) come possibili indicatori di flogosi, e studiarne un possibile ruolo come indicatori di prognosi in corso di patologia. Per APPs si intendono quelle proteine che in un disordine infiammatorio modificano la loro concentrazione almeno del 25%. Se tale variazione avviene in incremento si parla di proteine di fase acuta positive, se avviene in calo, di proteine di fase acuta negative (2).

Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 40 campioni di sangue provenienti da 37 cani e suddivisi in 4 gruppi (tabella 1). Il gruppo di controllo (gruppo 1) comprendeva 10 soggetti ritenuti sani sulla base dell'assenza di alterazioni cliniche ed ematologiche; il gruppo delle flogosi (gruppo 2) comprendeva 12 soggetti affetti da processi infiammatori di diversa natura e con sede differente; il gruppo delle leucemie (gruppo 3) 6 soggetti, che hanno visto conferma diagnostica sulla base dell'esame immunocitochimico e immunoistochimico; il gruppo delle leucocitosi reattive (gruppo 4) 9 soggetti, dove per leucocitosi reattiva si intende una forma patologica in grado di indurre leucocitosi, di origine però diversa dal processo infiammatorio o dalla leucemia (ad esempio stress e anemia emolitica immunomediata). Tutti i soggetti appartenenti ai gruppi patologici presentavano una conta leucocitaria superiore alle 18000 cellule/ μ l.

E' stato inoltre possibile ottenere un campione di sangue a distanza di tempo dal primo per un

soggetto appartenente a ciascuno dei gruppi patologici.

Per ogni campione sono stati eseguiti un esame emocromocitometrico completo e l'elettroforesi delle proteine, che però è stata effettuata in alcuni casi su campioni di siero e in altri su campioni di plasma, cosa che, se da una parte non altera le concentrazioni delle APPs e delle albumine, dall'altra non permette un confronto dei valori per quanto riguarda le β e le γ globuline.

Sono state inoltre dosate alcune APPs; più in particolare le albumine, considerate APPs negative, sono state calcolate sottraendo al valore delle proteine totali quello delle globuline ottenuto con l'elettroforesi; utilizzando kit disponibili in commercio (Tridelta Ltd, Irlanda) sono state invece misurate le concentrazioni ematiche delle seguenti APPs positive: aptoglobina (Hp), tramite metodica colorimetrica, la proteina C-reattiva (CRP) e la siero amiloide A (SAA) con metodica ELISA, e l' α 1 glicoproteina acida (AGP) tramite immunodiffusione radiale su gel di agarosio. Per la determinazione di quest'ultimo parametro è stato utilizzato un kit specifico per l'AGP felina, in quanto le istruzioni della casa produttrice del kit e dati riportati in letteratura, segnalano una cross-reattività tra AGP felina e canina. Nel presente lavoro tale reattività crociata non è stata sempre rilevata, e pertanto i valori di AGP ottenuti non sono stati considerati tra i risultati.

E' stato quindi calcolato l'indice di fase acuta (API) dal rapporto tra APPs positive rapide e lente e APPs negative rapide e lente, che nello specifico è dato dal rapporto tra le concentrazioni di Hp, SAA e CRP e quella delle albumine.

Infine sono stati calcolati i seguenti parametri di efficacia diagnostica dei test (3):

Sensibilità: la capacità del test di collocare i soggetti positivi (es: con APPs positive aumentate) nel gruppo dei positivi (es: cani con flogosi), evitando i falsi negativi;

Specificità: la capacità del test di collocare i soggetti negativi (es: con APPs positive nella norma) nel gruppo dei negativi (es: non affetti da flogosi), evitando i falsi positivi;

Valore predittivo positivo: indica la probabilità che un soggetto, inserito nel gruppo dei positivi sulla base della presenza di una determinata alterazione (es: aumento delle APPs positive), sia

realmente affetto dalla patologia in esame (es: flogosi);

Valore predittivo negativo: indica la probabilità che un soggetto, inserito nel gruppo dei negativi sulla base dell'assenza di una determinata alterazione (es: APPs positive non aumentate), sia realmente non affetto dalla patologia in esame.

Risultati

Per quanto riguarda i parametri ematologici, le concentrazioni di proteine totali, albumine e proteine di fase acuta (tabella 2), si è riscontrato un incremento significativo rispetto ai controlli per quanto riguarda i leucociti totali nel gruppo delle flogosi, nel quale la classe leucocitaria che ha visto le maggiori differenze statistiche, non solo rispetto al gruppo di controllo, ma anche rispetto a ciascuno degli altri gruppi, è stata quella dei neutrofili. Nel gruppo delle leucemie, invece, sono stati rilevati incrementi statisticamente significativi rispetto a tutti e tre gli altri gruppi per quanto riguarda leucociti totali, linfociti e cellule non classificabili.

La CRP aumenta in misura statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo in ciascuno dei gruppi patologici.

La SAA aumenta solo nel gruppo dei processi infiammatori, mentre in corso di flogosi e di leucemia si assiste ad un calo statisticamente significativo della concentrazione di albumine.

Non si è rilevata una differenza statisticamente significativa tra i gruppi per quanto riguarda l'API. Per tutte le proteine esaminate è stata inoltre rilevata una notevole variabilità individuale, anche in soggetti con la medesima patologia (Tabella 3).

L'analisi dei parametri di efficacia diagnostica non ha dato risultati soddisfacenti, se si esclude un elevato valore predittivo negativo (72%) in corso di flogosi per quanto riguarda SAA e albumine. L'analisi dei prelievi ripetuti ha permesso di rilevare un miglioramento dei parametri ematologici e proteici in tutti e tre gli animali esaminati, ma nei cani con prognosi infausta si sono registrati aumenti a carico delle proteine di fase acuta e dell'API (Tabella 4).

N°	GRUPPO 1	N°	GRUPPO 2	N°	GRUPPO 3	N°	GRUPPO 4
1	controllo	11	piometra	23	CLL	29	trauma precedente
2	controllo	12*	piometra	24	linfoma stadio V	30	torsione gastrica
3	controllo	13	pielonefrite	25	CLL	31	CLL in remissione
4	controllo	14	pancreatite	26	ALL	32	colangiocarcinoma
5	controllo	15	polmonite	27*	LGL	33*	anemia emolitica
6	controllo	16	pielonefrite	28	ALL	34	anemia emolitica
7	controllo	17	piometra			35	anemia emolitica
8	controllo	18	granulomatosi polmonare			36	predonazione
9	controllo	19	tonsillite			37	preoperatorio
10	controllo	20	ascesso linfonodo				
		21	polmonite				
		22	mucocele biliare				

Tabella 1: segnalamento dei cani esaminati e diagnosi definitiva (i cani campionati due volte sono indicati con l'asterisco).

	CONTROLLI	FLOGOSI	LEUCEMIE	REATTIVE
LEUCOCITI x 10 ³ /μl	10,5± 3,9	44,9± 31,2	101,1± 82,9*** ...▲▲	26,1± 10,5
NEUTROFILI x 10 ³ /μl	7,3± 3,6	37,8± 26,0***°°•	14,3± 6,1	20,2± 6,3
NON CLASSIFICABILI x 10 ³ /μl	0,0± 0,0	0,4± 1,5	38,7± 59,1**...▲▲	0,0± 0,0
LINFOCITI x 10 ³ /μl	2,2± 1,2	2,0± 1,3	46,4± 40,5*** ...▲▲▲	1,8± 1,4
PROTEINE g/dl	6,8± 0,5	7,2± 2,0	6,9± 1,5	6,9± 0,9
ALBUMINE g/dl	3,9± 0,5	2,8± 1,1*	2,9± 1,0*	3,3± 0,5
SAA μg/ml	5,7± 2,9	50,0± 59,2*	46,2± 64,4	30,2± 26,9
CRP μg/ml	16,6± 16,4	113,4± 97,1**	158,7± 81,9**	102,6± 81,5*
Hp mg/ml	0,3± 0,1	0,7± 1,0	0,2± 0,0	0,4± 0,2
API	0,08± 0,11	36,05± 101,01	5,92± 7,80	2,70± 2,68

Tabella 2: valori medi (± D.S.) rilevati nei quattro gruppi di cani, relativi ai valori di proteine totali, albumine e proteine di fase acuta, e relativa analisi statistica.

* = P<0.05 vs controlli; ** = P<0.01 vs controlli; *** = P<0.001 vs controlli; °° = P<0.01 vs leucemici; • = P<0.05 vs reattive; ●● = P<0.01 vs reattive; ●●● = P<0.001 vs reattive; ▲▲ = P<0.01 vs flogosi; ▲▲▲ = P<0.001 vs flogosi.

N° CANE	PATOLOGIA	SAA μg/ml	CRP μg/ml	Hp mg/ml
11	Piometra	21,4	349,5	0,22
12	Piometra	4,9	157,5	0,23
17	Piometra	24,8	144,0	1,82
13	Pielonefrite	101,4	116,8	0,23
16	Pielonefrite	11,1	47,8	0,27
15	Polmonite	17,6	66,9	0,27
21	Polmonite	135,2	40,2	1,04
23	CLL	150,6	165,8	0,24
25	CLL	8,6	183,6	0,22
26	ALL	4,6	219,2	0,28
28	ALL	103,5	120,1	0,30
33	Anemia emolitica	31,5	15,1	0,25
34	Anemia emolitica	16,2	87,8	0,40
35	Anemia emolitica	4,2	5,0	0,39

Tabella 3: variabilità individuale nella concentrazione delle proteine di fase acuta in soggetti affetti dalla medesima patologia.

N° CANE	SAA μg/ml		CRP μg/ml		Hp mg/ml		API		FOLLOW-UP
	1°prelievo	2°prelievo	1°prelievo	2°prelievo	1°prelievo	2°prelievo	1°prelievo	2°prelievo	
12	4,9	4,1	157,5	202,5	0,23	0,25	1,07	1,06	Guarigione
27	6,0	53,8	17,3	107,9	0,25	0,27	0,07	12,55	Decesso
33	31,5	61,2	15,1	58,3	0,25	0,47	0,43	6,20	Decesso

Tabella 4: confronto tra le concentrazioni ematiche delle proteine di fase acuta e indice di fase acuta, e loro rapporti con il follow-up nei soggetti campionati due volte a distanza di tempo.

Discussione

Nel presente lavoro non è stata riscontrata la cross-reattività più volte descritta tra AGP felina e AGP canina.

E' stata invece confermata l'elevata variabilità individuale presente in letteratura (4; 5) per quanto riguarda le concentrazioni delle APPs. A questo proposito va sottolineato come i livelli di

APPs sembrano dipendere non tanto dal tipo di patologia in atto, quanto da altri fattori (stadio di sviluppo, gravità della patologia, ecc...) non indagati nel presente lavoro. L'analisi dei risultati ottenuti suggerisce però che mentre la CRP non ha un ruolo rilevante come indicatore di flogosi, il calo delle albumine e l'incremento della SAA potrebbero essere considerati utili elementi diagnostici differenziali. In particolare, i due parametri sopra citati sono dotati di elevato valore predittivo negativo (72%) in corso di processo infiammatorio, il che significa ad esempio che un soggetto che, in corso di leucocitosi, presenti una bassa concentrazione di SAA e una elevata di albumine ha il 72% di probabilità di non essere affetto da flogosi. L'esame dei valori relativi all'API pone un interrogativo, dato che, nonostante valori medi sensibilmente superiori nei cani con flogosi, non si è rilevata una differenza statisticamente significativa tra i gruppi. In realtà uno solo dei soggetti appartenenti a tale gruppo patologico presentava valori elevatissimi di API (355,34), il che ha incrementato la deviazione standard ed annullato la significatività statistica. Ma se tale soggetto viene escluso dal gruppo, allora la differenza tra il gruppo di controllo e quello delle flogosi diviene significativa. I dati ottenuti nei soggetti campionati due volte permettono di delineare un possibile ruolo prognostico delle APPs, dato che tali parametri aumentano nei cani con prognosi infausta e non nell'unico cane che poi ha presentato remissione dei sintomi.

Conclusioni

In conclusione i dati raccolti suggeriscono di includere la misurazione delle proteine di fase acuta, ed in particolare di albumine e SAA, nei protocolli diagnostici di cani con leucocitosi, sia per identificare correttamente stati flogistici, sia per formulare prognosi attendibili indipendentemente dalla patologia in atto.

Bibliografia

1. Schultze A.E.: Interpretation of Canine Leukocyte Responses, in *Schalm's Veterinary Hematology*, Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C. Editors, 5^a Ed, cap.55, pag.366-81. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000.
2. Bochsler P.N., Slauson D.O.: Inflammation and Repair of Tissue, in *Mechanism of Disease. A textbook of comparative general pathology*, Slauson D.O, Cooper B.J. Editors, 3^a Edizione, cap.4, pag.140-245, Mosby, St. Louis, 2002.
3. Armitage P., Berry G., Statistical Methods on Epidemiology, pag. 455-83, in Armitage P., Berry G.: *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1985.
4. Solter P.F., Hoffmann W.E., Hungerford L.L., Siegel J.P., St Denis S.H., Dorner J.L.: Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 52:1738-42, 1991.
5. Kjelgaard-Hansen M., Jensen A.L., Kristensen A.T.: Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(2):81-7, 2003.

**ASPETTI CLINICI, CITOLOGICI E CITOFLUORIMETRICI DI UN CASO DI
NEOPLASIA ISTIOCITARIA MALIGNA IN UN BERNESE**

Bonfanti Ugo, Comazzi Stefano**, Gelain Maria Elena***

* Clinica Veterinaria Gran Sasso, Milano

** Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Riassunto

Un Bovaro del Bernese, femmina di 8 mesi, è stata riferita per astenia, dimagrimento progressivo, e disappetenza da circa 1 mese. Alla visita clinica manifestava riduzione delle masse muscolari, pallore delle mucose e moderata linfoadenomegalia generalizzata. L'esame emocromocitometrico evidenziava una grave anemia non rigenerativa, trombocitopenia, neutropenia e linfopenia nonché numerose cellule atipiche (12,922/ μ l), mononucleate, con nucleo tondeggianti, anisocariosi, nucleoli piccoli, multipli, cromatina reticolare ed ampio citoplasma chiaro spesso microvacuolizzato, contenente talora eritrociti intatti. Profilo biochimico completo e profilo coagulativo non manifestavano alterazioni di sorta a parte un moderato incremento di fosfatasi alcalina e fosforo inorganico, probabilmente conseguenza della giovane età del soggetto. L'esame citologico dei linfonodi evidenziava la presenza di una popolazione prevalente di cellule tondeggianti mono- o multinucleate, con caratteri di atipia nucleare e di evidenti eritrofagocitosi. Mediante agoaspirazione, dai linfonodi è stato ottenuto materiale, in seguito risospeso in PBS, per l'effettuazione degli studi citofluorimetrici. L'esame citologico del midollo ha evidenziato l'infiltrazione da parte di cellule atipiche e la grave deplezione di megacariociti e di precursori eritroidi e mieloidi. L'esame ecografico dell'addome ha evidenziato modesta epatosplenomegalia generalizzata e linfoadenomegalia dei linfonodi meseraici. Le prove citochimiche e citofluorimetriche hanno confermato l'elevata percentuale di elementi neoplastici risultati positivi alle esterasi non specifiche e agli antigeni CD18, CD11a, CD11b, CD11c e CD14, confermando il sospetto diagnostico di neoplasia istiocitaria maligna.

Parole chiave: Neoplasia istiocitaria maligna, citologia, citofluorimetria, Bernese, cane.

Summary

Clinical, cytological and flow cytometric features of a case of malignant histiocytic tumor in a Bernese mountain dog. A 8-months-old female Bernese mountain dog was presented with a 1-month history of weakness, weight loss and decreased appetite. Generalized muscle wasting, pallor of mucous membranes and moderate generalized lymphadenomegaly, and a serious non regenerative anemia, thrombocytopenia, neutropenia, lymphopenia and a high number of mononuclear atypical cells (12,922/microliter) were found. Neoplastic cells were characterized by round nuclei with anisocytosis, small multiple nucleoli, reticular chromatin and large, clear, often microvacuolated cytoplasm, sometimes containing intact erythrocytes. A coagulation profile and a serum biochemical profile and were within reference interval, a part a moderate increment of alkaline phosphatase (ALP) and phosphorus owing to the young age of the dog. Fine needle biopsy (FNB) of lymph nodes revealed the presence of a prevalent population of round cells, either mononucleated or multinucleated, with nuclear atypia and prominent erythrophagocytosis. With fine needle aspiration of lymph nodes, some nodal tissue was obtained and suspended in PBS for flow cytometry. Cytological examination of bone marrow, showed the infiltration of atypical cells and the depletion of precursor of blood cells. Abdominal ultrasound examination revealed moderate hepatosplenomegaly and mesenteric lymph nodes enlargement. Cytochemistry and flow cytometry showed positivity for non-specific esterase, CD18, CD11a, CD11b, CD11c e CD14, thus confirming the suspect of malignant histiocytic tumour.

Key Words: Malignant histiocytic tumour, cytology, flow cytometry, Bernese mountain dog.

**CARATTERISTICHE CITOPATOLOGICHE DELL'EMANGIOSARCOMA
NEL CANE**

Bertazzolo Walter *, DVM; *Dell'Orco Marta* *, DVM; *Bonfanti Ugo*, ** DVM; *Massedotti Carlo* §, DVM; *Caniatti Mario* #, DVM, DECVP; *Crippa Luca* #, DVM, DECLAM; *Roccabianca Paola* #, DVM, DECVP

*Pronto Soccorso Veterinario, Via Defendente, 29/A 26900 Lodi - **Clinica Veterinaria Gran Sasso, Via Donatello, 26 20131 Milano - §Clinica Veterinaria S. Antonio, Via Montale, 2 – 25084 Salò (BS)

#Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria; Sezione di Anatomia Patologica a Patologia Aviaria, Università degli Studi, via Celoria, 10 20133 Milano

Riassunto

L'emangiosarcoma è una neoplasia maligna di origine endoteliale che istologicamente può presentare una notevole eterogeneità morfologica, anche nell'ambito della stessa neoplasia. Proliferazioni neoplastiche di cellule endoteliali delimitanti spazi vascolari possono essere frammiste ad aree solide, infiltrazioni linfoidi ed ematopoiesi extramidollare. Il quadro citologico può pertanto risultare molto eterogeneo e di difficile interpretazione per il citopatologo.

Lo scopo del presente studio è stato di valutare le caratteristiche citologiche dell'HSA nel cane e di individuare eventuali rilievi che possano facilitare la diagnosi citologica di HSA.

Per poter essere inclusi nello studio, i campioni citologici ed istologici dovevano essere disponibili alla revisione, dovevano avere una diagnosi istologica di conferma ed una positività immunocitochimica per il fattore VIII-related antigen ed per l'antigene CD31.

Trentadue campioni citologici con una diagnosi sospetta per HSA vennero individuati retrospettivamente. Di questi, 18 soddisfacevano i criteri di inclusione alla studio. Citologicamente, 13/18 casi mostravano cellule sarcomatose con severi criteri di atipia, abbondante citoplasma basofilo, nuclei pleomorfi ed uno o più nucleoli prominenti. Quattro su 18 mostravano una commistione di cellule di aspetto fusato ad altre con caratteristiche epitelioidi, mentre 1/18 mostrava cellule fuse di aspetto monomorfo. Coesività era presente in 15/18 casi. Fini vacuolizzazioni intracitoplasmatiche erano presenti in 17/18 casi. Rilievi addizionali erano: presenza di abbondante contaminazione ematica (17/18 casi), leucocitosi (10/18 casi) ed eosinofilia (5/18) di fondo, presenza di emosiderofagi (8/18 casi) ed ematopoiesi extramidollare (8/18). Leucociti apoptoici erano presenti in 14/18 casi. Architetture pseudo-acinari in 4 casi.

In conclusione, gli HSA nel cane possono presentare notevole eterogeneità istologica e citologica. La diagnosi citologica di HSA deve essere sempre posta con cautela e deve in ogni

caso essere supportata da istopatologia ed immunocitochimica.

Parole chiave: Emangiosarcoma, citopatologia, cane

Summary

Cytopathological features of canine hemangiosarcoma. The aim of this study was to evaluate the cytological features of canine HSA and to search for additional clues that can increase the diagnostic value of cytology for this tumor.

To be included in this study, samples should be available for reviewing on both cytopathology and histopathology, should have an histological confirmation and should be positive for factor VIII-related antigen and/or for CD31 antigen on immunohistochemistry.

Thirty-two samples with a suspected cytological diagnosis of HSA were retrospectively found. Of these, 18 met the inclusion criteria and were included in this study. On cytology, 13/18 cases showed high grade sarcomatous cells, with abundant basophilic cytoplasm, severely pleomorphic nuclei and one or more prominent nucleoli. Four of 18 showed a mixture of sarcomatous cells and neoplastic cells with epithelioid features, whereas 1/18 had a monomorphic spindle-cell appearance. Cellular cohesivity was observed in 15/18 cases. Small intracytoplasmic vacuolation were found in 17/18 cases. Additional features were: moderate to abundant blood contamination (17/18 cases), background leukocytosis (10/18) or eosinophilia (5/18), presence of hemosiderophages (8/18) and extra-medullary hematopoiesis (8/18). Apoptotic leukocytes were admixed with neoplastic cells in 14/18 cases. Pseudo-acinar structures were observed in 4 cases.

In conclusion, HSA is a very heterogeneous tumor on both cytology and histology. Cytological diagnosis of HSA must be made with caution and should always be supported by histological and immunohistochemical confirmation.

Key Words: Hemangiosarcoma, cytopathology, dog.

UN CASO DI SINDROME UREMICO-EMOLITICA IN UN CANE

Dell'Orco Marta*, Bertazzolo Walter*, Pagliaro Luigi, Roccabianca Paola*****

*Pronto Soccorso Veterinario, Via Defendente, 29/a 26900 Lodi

** Clinica Veterinaria S. Angelo, L.go Nino Bixio 36, 26866 S. Angelo Lodigiano

*** Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, Via Celoria, 10. 20133, Milano

Riassunto

Un cane boxer, femmina sterilizzata di 3 anni veniva riferita presso il Pronto Soccorso Veterinario per un episodio acuto di gastroenterite emorragica. Alla visita clinica il cane si presentava letargico e gravemente disidratato. Il plasma ottenuto appariva marcatamente emolitico e le urine di colore brunastro. Dagli esami di laboratorio venivano riscontrati: emolisi intavascolare con schistocitosi, trombocitopenia, leucocitosi neutrofila, emoglobinuria e iperazotemia. Nonostante la terapia intensiva, l'emolisi e l'emoglobinuria continuavano, l'iperazotemia peggiorava e compariva una moderata anemia con reticolocitosi, associata a una grave trombocitopenia e ittero. I proprietari optavano per l'eutanasia. Le lesioni istologiche interessavano principalmente i reni e l'intestino e consistevano in una grave necrosi arteriolare fibrinoide con trombi di fibrina soprattutto a livello dei vasi glomerulari renali. Considerati i segni clinici, i risultati di laboratorio e le lesioni istologiche veniva fatta una diagnosi di sindrome uremico-emolitica. Nell'uomo la sindrome uremico-emolitica colpisce prevalentemente i bambini ed è caratterizzata da insufficienza renale acuta, trombocitopenia e anemia emolitica microangiopatica. Negli animali domestici è molto rara. Sembra sia causata da una proliferazione batterica intestinale di *E.Coli* sierotipo 0157:H7. Le verocitotossine prodotte dal batterio causano lesioni endoteliali, attivazione dell'emostasi e trombosi microvascolare principalmente a livello renale. La terapia consiste nella dialisi precoce, nel trattamento dell'ipertensione e degli squilibri elettrolitici e nella plasmaferesi nei casi più gravi. La limitata disponibilità di alcune di queste terapie in medicina veterinaria riduce la probabilità di sopravvivenza degli animali colpiti.

Parole chiave: cane, gastro-enterite emorragica, anemia emolitica, trombocitopenia, insufficienza renale acuta.

Summary

Hemolytic-uremic syndrome in a dog. A 3-year-old spayed female Boxer was presented due to acute onset of hemorrhagic gastro-enteritis. Haemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure were detected. Despite supportive therapies, dog conditions worsened and owners elected euthanasia. Histological lesions were consistent with severe microvascular thrombosis involving only the renal and intestinal arterioles. Final diagnosis was haemolytic-uremic syndrome. This syndrome is described in human and it is rare in animal. It seems to be caused by gastrointestinal proliferation of verotoxins producing *E.Coli* serotype 0157:H7. Bacterial toxins cause endothelial injury, activation of hemostasis and thrombosis confined exclusively to the kidneys. Therapy consists of supportive care with early dialysis for acute renal failure, treatment of hypertension, correction of electrolytic and fluid balance for diarrhoea and in the most severe cases plasma exchange.

Key words: dog, hemorrhagic gastro-enteritis, hemolytic anemia, thrombocytopenia, acute renal failure.

RILIEVI CLINICO-DIAGNOSTICI IN CORSO DI ARTROPATIE DEL CANE

Mazzullo Giuseppe, De Vico Gionata

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Messina - Viale Annunziata, 98168 Messina

Riassunto

Scopo del presente lavoro è quello di fornire un contributo pratico sulla diagnostica delle patologie articolari nella specie canina presentando e correlando gli aspetti clinici e radiologici di alcune affezioni articolari osservate in quattro cani di differente razza, età e sesso, e le rispettive valutazioni diagnostiche emerse dall'esame citologico del liquido sinoviale prelevato in ognuno dei soggetti.

Dal punto di vista citopatologico, le artropatie da noi esaminate potevano essere diagnosticate come emartro acuto, artropatie degenerative, e artropatie infiammatorie.

I risultati ottenuti sottolineano ulteriormente come l'applicazione di semplici ma, nello stesso tempo, importanti metodiche di diagnostica patologica possano senza dubbio contribuire alla definizione di una diagnosi clinica, indicando al veterinario pratico quale possa essere il migliore approccio terapeutico in casi di artropatie.

Parole chiave: artropatie, citologia diagnostica, liquido sinoviale, cane.

Summary

Clinical and diagnostic findings in canine joint diseases

Joint diseases in dogs and cats are determined by different etiopathogenic factors that usually produce obvious lameness in the affected limb. Diagnostic procedures to determine the exact cause or the localisation of the joint damage include anamnesis, complete clinical examination, instrumental investigations (i.e. radiology, arthroscopy), synovial fluid cytological examination, microbiological assays. Examination of synovial fluid is particularly suggested in case of both monoarticular disease and, better, polyarthropathies with associated intrarticular effusions. In joint diseases, cytological examination of synovial fluid could lead to a diagnosis of: acute hemarthrosis, non neoplastic

(degenerative, inflammatory) arthropathies, neoplastic diseases.

Four dogs of different breed, age and sex were evaluated for lameness. In all of them, clinical examination and radiographic investigation were performed. Samples of synovial fluid were collected by ultrasound-guided arthrocentesis and direct smears were prepared and stained with May-Grünwald Giemsa.

Comparing the clinical findings and the radiological and cytological features, the observed joint diseases could be classified respectively as acute hemarthrosis, degenerative joint disease, osteosarcoma and septic arthritis.

Our results underline one more time that the application of simple but important pathological diagnostic procedures could undoubtedly contribute to the definition of a clinical diagnosis also in case of a joint disease in small animals. In human medicine, fine needle aspiration of synovial fluid is considered a valid, rapid and minimally invading diagnostic technique used in the investigation of musculoskeletal pathologies. On the contrary, in veterinary medicine its use for pre-surgery characterisation of the diseases is still debated. The advantages of cytological examination of synovial fluid consist in the possibility to examine cells populations sampled without surgery; it is not a dangerous technique, and, therefore, suitable in elder or ill animals. Furthermore, it could be repeated at short intervals and in more sites, with the aim of monitoring the evolution of an examined lesion.

Key words: joint diseases, diagnostic cytology, synovial fluid, dog.

Introduzione

Le patologie che coinvolgono le articolazioni dei cani e dei gatti hanno eziologie diverse e si suddividono in due grandi categorie: non infiammatorie e infiammatorie (1).

Le procedure diagnostiche per determinare l'esatta causa o la localizzazione del danno articolare comprendono l'anamnesi, la visita clinica completa (esame ispettivo e palpatorio, accompagnato, talora, dall'anestesia locale), indagini strumentali (radiografia, artroscopia, scintigrafia, termografia), esame del liquido e della membrana sinoviali unitamente ad eventuali prove colturali. Talvolta, soprattutto quando si sospetta una malattia multisistemica (es.: LES), possono essere utili analisi biochimiche ed esame delle urine.

In particolare, l'esame del liquido sinoviale è indicato sia nel caso di affezione monoarticolare, ma ancor più in caso di poliartropatie associate ad effusioni articolari (2). Caratteristiche da valutare sono: volume ottenuto, colore, torbidità, viscosità, qualità/concentrazione della mucina (acido ialuronico), concentrazione proteica, conta delle cellule nucleate (eseguibile manualmente, mediante microscopio o emocitometro, o con conta globuli elettronico), valutazione citologica.

L'insieme dei dati clinico-diagnostici, strumentali e, soprattutto, delle determinazioni effettuate sul liquido sinoviale permette di classificare le artropatie in: emartro acuto, malattie non neoplastiche, che comprendono artropatie degenerative (da alcuni Autori definite anche non infiammatorie e non purulente) e artropatie infiammatorie, e malattie neoplastiche (3).

Scopo del presente lavoro è quello di fornire un contributo pratico sulla diagnostica delle patologie articolari nella specie canina presentando gli aspetti clinici, radiologici e citologici osservati in quattro cani occorsi alla nostra attenzione.

Materiali e metodi

Il nostro studio è stato effettuato su quattro cani di differente razza, età e sesso affetti da zoppia sottoposti ad esami clinici e radiografici presso strutture private. Il prelievo del liquido sinoviale veniva effettuato mediante artrocentesi ecoguidata. I preparati citologici venivano inviati al nostro laboratorio e colorati con May-Grünwald Giemsa. La lettura al microscopio seguiva i seguenti criteri: esame del corpo e del fondo del preparato, cellularità, classificazione delle cellule presenti, formulazione di un giudizio di compatibilità diagnostica.

Risultati

Caso n. 1 – Meticcio, maschio, anni 3.

Anamnesi: zoppia all'arto anteriore destro da circa 10 giorni.

EOG: nulla da segnalare.

EOP: si evidenziava una tumefazione calda e dolente a livello della regione del carpo destro.

Esame radiografico: le proiezioni dorso-palmare e latero-laterale evidenziavano una tumefazione radiopaca a livello della regione carpica unitamente a lussazione della fila prossimale delle ossa carpali.

Esame citologico: i preparati, a piccolo ingrandimento, si presentavano di aspetto decisamente ematico. La cellularità era normale e caratterizzata da neutrofili ben conservati, talora ipersegmentati, ed elementi mononucleati con aspetti di eritrofagocitosi (Figura 1).

Giudizio diagnostico: i quadri osservati risultavano compatibili con un emartro acuto.

Caso n. 2 - Dobermann, femmina, anni 5.

Anamnesi: abbattimento con difficoltà nella normale deambulazione, dimagrimento, scarso appetito.

EOG: ottundimento del sensorio, dimagrimento, mucose pallide, LL NN regionali aumentati di volume.

EOP: tumefazione fredda e dolente a livello della regione del gomito destro, con ipotrofia muscolare dell'intero arto.

Esame radiografico: la proiezione laterale effettuata con arto flesso a 90° evidenziava a livello della superficie posteriore della regione meta-epifisaria distale dell'omero un addensamento radiopaco caratterizzato da fenomeni proliferativi periosteali a carattere espansivo e fenomeni di lisi ossea.

Esame citologico: i preparati, a piccolo ingrandimento, si presentavano di aspetto ematico, con cellularità normale e caratterizzata da elementi neutrofilici ben conservati e assenza di eritrofagocitosi. A più forte ingrandimento, l'attenta osservazione del vetrino permetteva di evidenziare la presenza di cellule grandi, pleomorfe, da allungate a poligonali, disposte singolarmente o più frequentemente in piccoli gruppi, talora multinucleate. Il citoplasma, frequentemente basofilo, da scarso a abbondante, presentava piccoli vacuoli chiari. Il nucleo, da centrale a eccentrico, si mostrava spesso

iperpigmentato con nucleoli prominenti, a volte spigolosi, di dimensioni variabili ed ipercroamfici. L'anisocariosi era in generale marcata e il rapporto N:C a favore del primo. Non evidenti figure mitotiche. (Figure 2, 3).

Giudizio diagnostico: in base ai reperti osservati, veniva emessa una diagnosi compatibile con neoplasia mesenchimale maligna, definitivamente perfezionata in osteosarcoma in virtù della comparazione con l'esame radiologico.

Caso n. 3 - Rottweiler, maschio, anni 2.

Anamnesi: da circa un mese zoppia sul treno posteriore, segni di dolore durante la deambulazione.

EOG: nella norma.

EOP: dolore alla palpazione dell'arto posteriore sinistro a livello dell'articolazione coxo-femorale, unitamente a diminuzione del tono muscolare.

Esame radiografico del bacino: in proiezione ventro-dorsale, evidenziava un'alternanza di aree radiopache e radiotrasparenti a livello della testa femorale sn con rimaneggiamento dell'angolo cranio-laterale acetabolare verosimilmente dovuto a processo artrosico in atto. Arto controlaterale nella norma.

Esame citologico: i preparati citologici mostravano un abbondante materiale di fondo granulare eosinofilo, proteinaceo, a testimonianza di un verosimile incremento della concentrazione proteica e quindi della viscosità del liquido articolare in esame. La componente cellulare era normale per quanto riguarda gli elementi infiammatori. Occasionalmente veniva osservata una discreta quantità di sinoviociti singoli o in cluster, con aspetti di marcata basofilia citoplasmatica. Inoltre, numerosi elementi irregolari, singoli o in gruppi, erano variamente distribuiti nel preparato; per la loro affinità tintoriale basofila venivano interpretati come frammenti cartilaginei (Figura 4).

Giudizio diagnostico: sulla base dei reperti osservati il quadro citologico lasciava intuire una lesione di tipo erosivo e, pertanto, veniva emessa una diagnosi citologica compatibile con artropatia degenerativa/artrosi. L'esame istologico, successivamente effettuato su una biopsia della testa del femore, unitamente ai dati clinico-radiologici, perfezionava definitivamente la diagnosi di necrosi asettica della testa femorale.

Caso n. 4 - Dalmata, maschio, anni 2.

Anamnesi: da circa 20 giorni mancato appoggio dell'arto posteriore destro, dolore alla palpazione. EOG: modesto abbattimento, temperatura 39,5°C. EOP: tumefazione calda e dolente a livello della regione tarso-metatarsica dell'arto destro.

Esame radiografico del piede destro: effettuato in proiezione laterale, evidenziava una tumefazione radiopaca intressante l'intera articolazione del tarso unitamente ad un processo di addensamento radiopaco sia periostale che lungo la superficie volare e dorsale del tarso e dei metatarsei.

Esame citologico: i preparati, a piccolo ingrandimento, presentavano un fondo eosinofilo ed un elevato numero di cellule, caratterizzato da una predominanza di neutrofili, macrofagi attivati e qualche sinoviocita. A più forte ingrandimento si potevano apprezzare differenti alterazioni degenerative dei neutrofili (Figura 5), nonché la presenza di elementi batterici sia liberi che intracellulari. A tratti era anche possibile osservare qualche gruppo di cellule mononucleate/sinoviociti coesivi a citoplasma fortemente basofilo, con nuclei ipercromatici, circondati da elementi infiammatori (Figura 6), la cui presenza deponeva per una iperplasia sinoviale reattiva benigna.

Giudizio diagnostico: artrite suppurativa ad eziologia batterica.

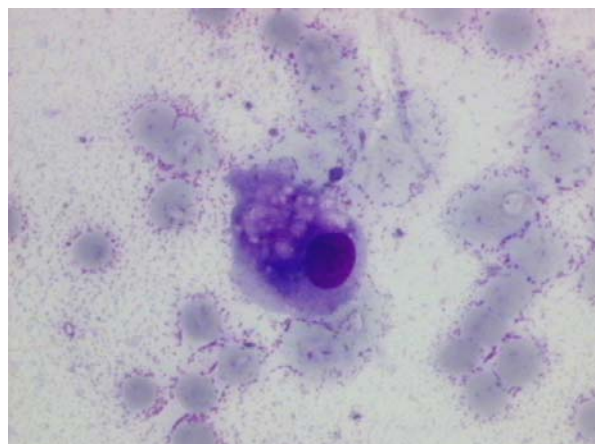


Figura 1. Caso n. 1. Meticcio, maschio, anni 3. Preparato di aspetto ematico, neutrofili ben conservati, elementi mononucleati con aspetti di eritrofagocitosi. Emartro. MGG, obiettivo 40X.

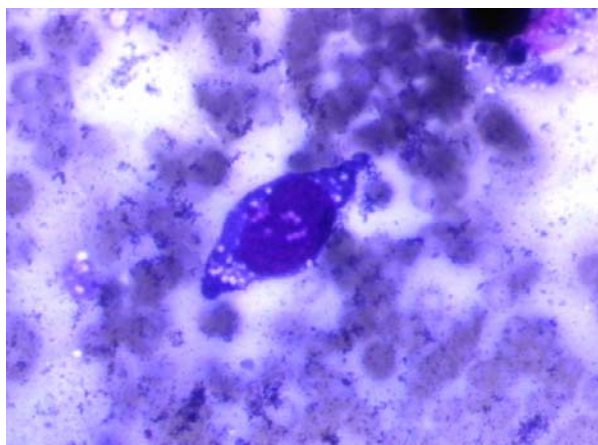


Figura 2. Caso n. 2 - Dobermann, femmina, anni 5. Cellula di grandi dimensioni, di forma allungate, con un singolo voluminoso nucleo; citoplasma basofilo contenente piccoli vacuoli chiari. Osteosarcoma. MGG, obiettivo 40X.

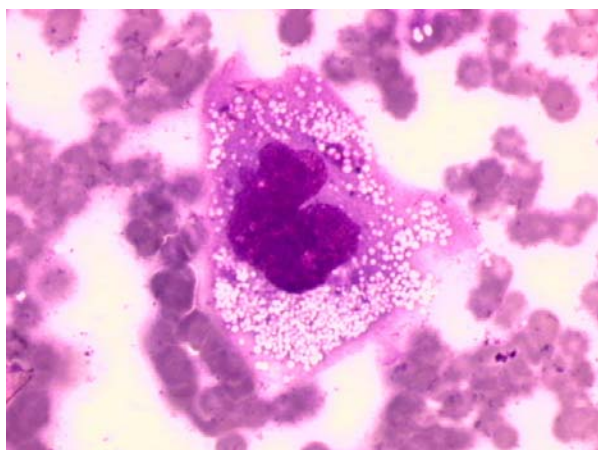


Figura 3. Caso n. 2. Dobermann, femmina, anni 5. Cellula multinucleata. Osteosarcoma. MGG, obiettivo 40X.

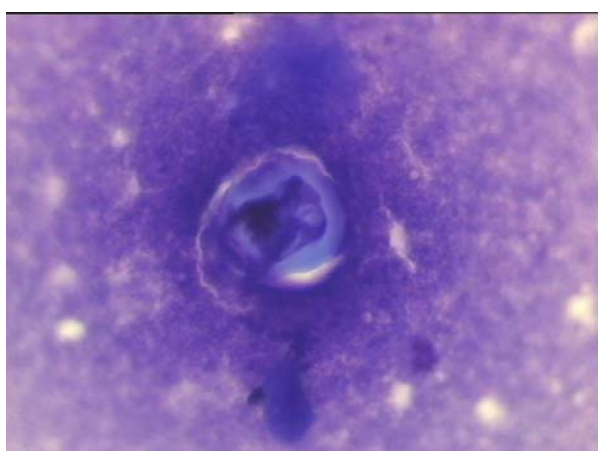


Figura 4. Caso n. 3. Rottweiler, maschio, anni 2. Numerosi elementi irregolari, singoli o in gruppi,

assumetti affinità tintoriali basofile (frammenti cartilaginei). Artropatia degenerativa/artrosi. MGG, obiettivo 40X.

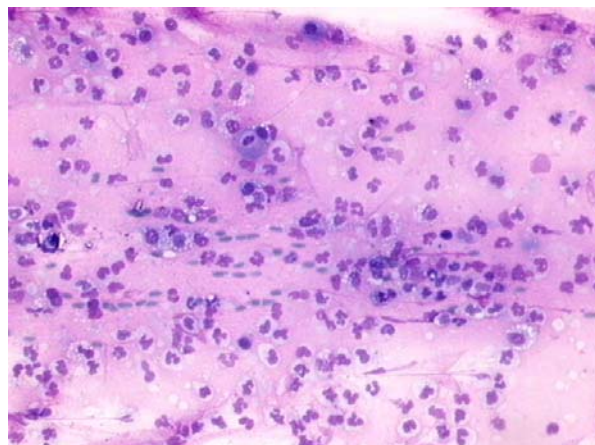


Figura 5. Caso n. 4. Dalmata, maschio, anni 2. Preparato altamente cellulare, prevalentemente caratterizzato neutrofili in vario stato di degenerazione. Artrite settica. MGG, obiettivo 10X.

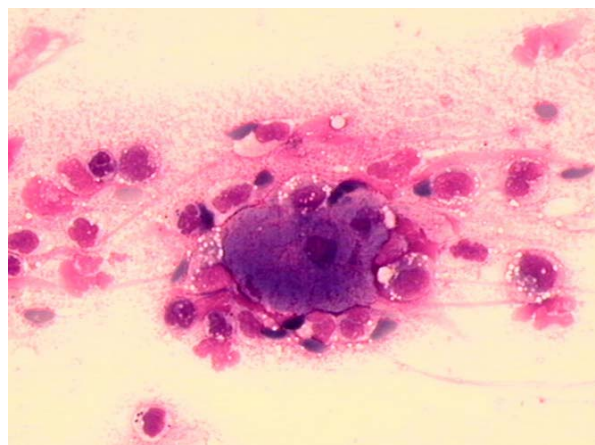


Figura 6. Caso n. 4. Dalmata, maschio, anni 2. Cellule mononucleate/sinoviociti coesive a citoplasma fortemente basofilo, nuclei ipercromatici, circondati da elementi infiammatori. Artrite settica. MGG, obiettivo 20X.

Discussione

In medicina umana, la citologia agoaspirativa nelle diagnosi delle patologie ossee, muscolari e del liquido sinoviale è ormai da tempo considerata una valida tecnica diagnostica, di rapida esecuzione e minimamente invasiva, in grado di valutare noduli e tumefazioni superficiali o profondi e di differenziare, attraverso l'esame morfologico degli elementi cellulari prelevati,

processi flogistici da patologie neoplastiche primitive o di origine metastatica.

In medicina veterinaria, invece, è ancora controverso il suo utilizzo come mezzo di caratterizzazione prechirurgica di lesioni muscolo-scheletriche.

I vantaggi di questo metodo consistono nella possibilità di esaminare popolazioni cellulari prelevate con tecniche che non richiedono interventi chirurgici, sono prive di pericoli anche in animali anziani o defecati e possono essere ripetute a brevi intervalli di tempo ed in più sedi contemporaneamente, in modo da seguire le modificazioni o gli stadi evolutivi della lesione in esame. Le limitazioni sono dovute principalmente al fatto che non è sempre possibile prelevare materiale sufficiente ad allestire preparati con una densità cellulare adeguata per interpretare correttamente le caratteristiche degli elementi cellulari in esame, rendendo così necessario effettuare dei prelievi biotici per l'esame istologico al fine di poter formulare una diagnosi accurata e definitiva (4).

Ciò malgrado, il liquido sinoviale viene ormai frequentemente esaminato quando si ha un sospetto di malattia articolare, anche se possono essere richiesti, come già riportato, ulteriori esami di tipo radiologico, microbiologico, sierologico, istopatologico e tests per malattie immuno-mediate (5).

Conclusioni

I reperti descritti sottolineano come l'applicazione di semplici ma, nello stesso tempo, importanti metodiche di diagnostica patologica possano senza dubbio contribuire alla definizione di una diagnosi clinica, indicando al veterinario pratico quale possa essere il migliore approccio terapeutico anche in casi di artropatie e zoppie negli animali da compagnia.

Bibliografia

1. Pedersen NC, Morgan JP, Vasseur PB: Malattie articolari dei cani e dei gatti. In: Ettinger SJ & Feldman EC: Trattato di Clinica Medica Veterinaria. Malattie del Cane e del Gatto. Vol. 2, 1862-1886, Antonio Delfino Editore, Roma, 2002.
2. Else RW: Locomotor System. In: Davidson M, Else RW, Lumsden JH: Manual of Small Animal Clinical Pathology, 203-225, BSAVA, 1998.
3. Parry BW: Liquido Sinoviale. In: Cowell RL and Tyler RD: Citologia Diagnostica ed Ematologia del Cane e del Gatto, 104-119, Mario Caniatti Ed., UTET, Torino, 2001.
4. Cantoni AM: L'esame citologico nella diagnosi delle patologie ossee, muscolari e del liquido sinoviale. In: *Lezioni di Citologia Diagnostica Veterinaria*, Ed. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 44:121-129, 1999.
5. Baker R, Lumsden JH: Synovial fluid. In: Baker R, Lumsden JH: *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat*, 209-221, Mosby, St. Louis, Missouri, USA, 2000.

DATI PRELIMINARI SULL'ESPRESSIONE CITOFUORIMETRICA DEGLI ANTIGENI COMUNI CD18 E CD45 NEI LEUCOCITI EMATICI DEL CANE IN CONDIZIONI NORMALI E IN CORSO DI NEOPLASIE EMATOPOIETICHE

Gelain Maria Elena, Giordano Alessia*, Peralisi Cristina§, Comazzi Stefano**

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

§ Centro Diagnostico Veterinario srl, Milano

Riassunto

Gli antigeni CD18 e CD45 sono markers pan-leucocitari utilizzati in citofluorimetria per distinguere le popolazioni leucocitarie da sottoporre ad ulteriori analisi. La β_2 integrina (CD18) rappresenta la principale molecola di adesione leucocitaria ed è presente su tutti i leucociti solitamente associata ad una subunità α differente nelle diverse classi cellulari. I granulociti e i monociti esprimono circa dieci volte più CD18 che i linfociti. CD45 è una tirosin-fosfatasi di membrana coinvolta nella attivazione cellulare e generalmente espressa ad elevate concentrazioni su linfociti e monociti.

Scopo del presente lavoro è stato mettere a punto un protocollo citofluorimetrico che permettesse di identificare le differenti classi di leucociti ematici, in funzione dell'espressione quantitativa di CD18 e CD45, mediante doppia marcatura. Questo può essere utile per una accurata analisi delle sottopopolazioni leucocitarie e per l'evidenziazione di espressioni aberranti in eventuali forme neoplastiche con il solo utilizzo di due anticorpi monoclonali (Mab).

Sono stati analizzati 10 campioni di sangue di cani privi di patologie clinicamente evidenti. I campioni lisati sono stati sottoposti a doppia marcatura con i Mab anti CD18FITC e anti CD45PE e acquisiti al citofluorimetro. Le differenti popolazioni leucocitarie sono state evidenziate su un grafico a punti FL1 vs FL2. I risultati delle differenti popolazioni sono stati confrontati con quelli ottenuti da conte manuali su vetrino colorato con May Grunwald-Giemsa. Lo stesso protocollo è stato poi esteso a cani con alterazioni ematologiche riferibili a patologie neoplastiche e reattive.

I risultati hanno evidenziato la presenza di quattro popolazioni ben distinte tra loro, identificabili come granulociti neutrofili (ad intermedio CD18 e

basso CD45), monociti (ad elevati CD18 e CD45), linfociti (ad elevato CD45 e basso CD18) e eosinofili (ad elevato CD18 e basso CD45). Le percentuali di cellule nelle differenti classi si sono mostrate proporzionali a quelle ottenute dalle conte microscopiche. L'applicazione di tale metodica ai casi patologici ha permesso di evidenziare come i neutrofili immaturi presentino una più bassa espressione di CD18 rispetto agli elementi maturi e come siano spesso chiaramente identificabili sottopopolazioni neoplastiche, caratterizzate soprattutto dalla sottoespressione di uno o entrambi gli antigeni. Nella maggior parte dei casi inoltre l'origine delle cellule neoplastiche, già chiaramente intuibile, è stata ulteriormente confermata dall'estensione del fenotipo neoplastico.

I risultati ottenuti sembrano confermare come l'utilizzo contemporaneo degli anticorpi anti CD18 e antiCD45 permetta di differenziare le classi di leucociti ematici in condizioni normali e consenta di evidenziare le sottopopolazioni neoplastiche o reattive mediante l'utilizzo di solo due anticorpi monoclonali.

Parole chiave: cane, citofluorimetria, CD18, CD45, leucemia

Summary

Preliminary results of flow cytometric expression of common antigens cd18/cd45 in canine normal leukocyte and in hematopoietic neoplasia. Aim of this study was to define a useful flow cytometric protocol to identify, in canine blood samples, the different hematic leukocyte population using double labeling (CD18-FITC/CD45-PE). This procedure allowed an efficient discrimination between normal leukocyte in healthy dog and facilitated

identification of aberrant antigenic expression in neoplastic cells.

Key words: dog, flow cytometric, CD18, CD45, leukaemia.

Introduzione

La citofluorimetria è considerata il metodo d'elezione per identificare, quantificare ed immunofenotipizzare le popolazioni patologiche in corso di neoplasie ematopoietiche. Le sole caratteristiche morfologiche, analizzate attraverso forward scatter (FSC)/side scatter (SS), sono però spesso insufficienti per riconoscere in modo adeguato le sottopopolazioni leucocitarie anomale, soprattutto se presenti in basse percentuali⁽¹⁾. Per ovviare a questo inconveniente vengono utilizzati marker immunologici, alcuni dei quali espressi in modo differente dalle varie classi leucocitarie. L'antigene CD45 (LCA, leukocyte-common antigen) è una glicoproteina integrale di membrana, ad attività tirosin-fosfataseica, coinvolta nell'attivazione di linfociti T e B. È espressa da tutte le cellule emopoietiche (esclusi globuli rossi maturi e i loro progenitori), con densità maggiore sulla superficie di linfociti e monociti^(5,6). La sua espressione è invece minore sui linfociti B⁽³⁾ e nei blasti⁽¹⁾. In medicina umana l'associazione CD45/SS è considerata il metodo d'elezione per discriminare tra cellule neoplastiche e normali⁽⁷⁾. CD18 (β_2 integrina), una delle principali molecole di adesione leucocitaria, forma degli eterodimeri legandosi con le subunità alfa (CD11a, CD11b, CD11c, CD11d) presenti nelle varie classi leucocitarie. Questa molecola è espressa in modo differente sulla superficie di tutti i leucociti. In particolare i granulociti ed i macrofagi mostrano un'espressione 10 volte maggiore rispetto ai linfociti^(2,4). La sua espressione diminuisce invece nei neutrofili e nei monociti durante i processi flogistici⁽⁹⁾. Anticorpi anti-CD18 sono utilizzati, nell'analisi del midollo osseo, per differenziare le cellule eritroidi dalle mieloidi⁽⁸⁾.

Scopo del lavoro. Scopo del presente lavoro è stato mettere a punto un protocollo citofluorimetrico che permettesse di identificare le differenti classi di leucociti ematici, in funzione dell'espressione quantitativa di CD18 e CD45, mediante doppia marcatura. Questa metodica può

essere utile per un'accurata analisi delle sottopopolazioni leucocitarie e per l'evidenziazione di espressioni aberranti in eventuali forme neoplastiche, con l'ausilio di due soli anticorpi monoclonali (Mab).

Materiali e metodi

Sono stati analizzati campioni di sangue periferico di 10 cani senza patologie clinicamente evidenti, con esame emocromocitometrico e formula leucocitaria nella norma. I campioni, dopo la lisi delle emazie, sono stati sottoposti a doppia marcatura con i Mab anti CD18_{FITC} e anti CD45_{PE}. Per ogni campione sono state acquisite 10.000 cellule al citofluorimetro (FACScan BD Biosciences) e le popolazioni leucocitarie sono state evidenziate su un grafico a punti FL1 vs FL2. I risultati delle differenti popolazioni sono stati confrontati con quelli ottenuti da formule effettuate manualmente da due operatori indipendenti contando 200 cellule su vetrino colorato con May Grunwald-Giemsa. Lo stesso protocollo è stato poi applicato a 7 cani con leucocitosi reattiva e a 10 cani con alterazioni ematologiche riferibili a patologie neoplastiche. Nelle forme leucemiche si è estesa l'analisi fenotipica delle popolazioni patologiche utilizzando un pannello anticorpale che permettesse di identificare le forme linfoidi (CD3, CD4, CD8, CD21), granulocitarie e monocitarie (CD11b, NSA, CD14, MHC II) e la presenza di blasti (CD34).

Risultati

Nei cani sani si è potuto evidenziare la presenza di quattro popolazioni leucocitarie ben distinte tra loro in base alle diverse espressioni degli antigeni CD18 e CD45: i granulociti neutrofili, con livelli intermedi di CD18 e bassi di CD45, i monociti, con elevata espressione di entrambi gli antigeni, i granulociti eosinofili, caratterizzati da livelli bassi di CD45 e elevati di CD18 ed infine i linfociti, con alta espressione di CD45 e bassa di CD18. Si è inoltre dimostrata la presenza di una sottopopolazione linfocitaria caratterizzata da una minor espressione di CD45 (Fig. n°1). All'analisi immunofenotipica questa popolazione è risultata essere CD21 positiva, riconducibile quindi a linfociti B maturi. Le percentuali di cellule nelle differenti classi ottenute dall'analisi

citofluorimetrica, si sono mostrate proporzionali a quelle ottenute dalle conte microscopiche. In particolare, considerando sia gli animali sani sia gli animali con leucitosi flogistiche, nei quali la morfologia leucocitaria era facilmente riconoscibile, si è ottenuto un buon coefficiente di correlazione per monociti (coefficiente di Pearson = 0.9), per linfociti e granulociti eosinofili (coefficiente di Pearson = 0.8), mentre minore è risultata la correlazione per i granulociti neutrofili (coefficiente di Pearson = 0.7). L'applicazione di tale metodica alle leucitosi reattive ha evidenziato come i neutrofili immaturi presentano un'espressione più bassa di CD18, rispetto agli elementi maturi. Questo ha permesso di differenziarli come due popolazioni distinte, mentre al solo esame morfologico si presentavano simili e indistinguibili tra loro (Fig. n°2). I 10 casi di neoplasie ematopoietiche erano rappresentati da 4 linfomi allo stadio V (Fig. n°3), 2 leucemie linfoidi acute (Fig. n°4), 1 leucemia linfocitica cronica (Fig. n°5), 1 leucemia mieloide acuta, 1 leucemia cronica in crisi blastica (Fig. n°6) e 1 leucemia acuta non ulteriormente classificata. In tutti i casi è stato possibile identificare la popolazione neoplastica, spesso caratterizzata da una più bassa espressione degli antigeni panleucocitari, la cui origine cellulare (linfoide o mieloide) era facilmente intuibile dal citogramma CD18 Vs CD45.

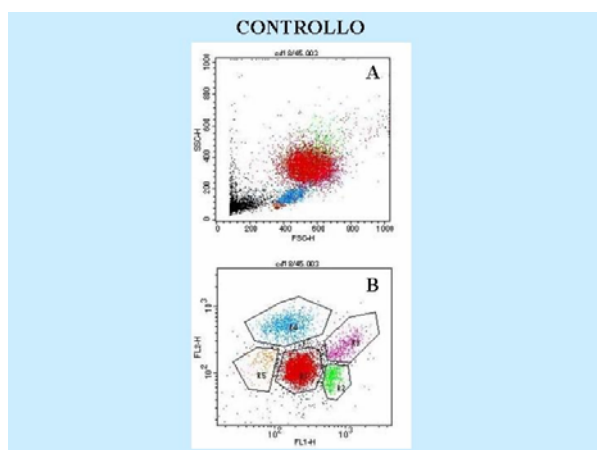


Figura n°1. Analisi citofluorimetrica di un campione di controllo: (A) FSC/SS, (B) CD18 in FL1 e CD45 in FL2. Nel riquadro B si distinguono i granulociti neutrofili (R1), i granulociti eosinofili (R2), monociti (R3), linfociti (R4), linfociti B (R5).

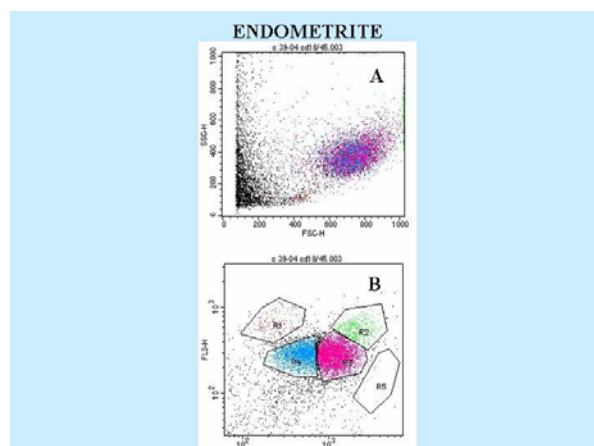


Figura n°2. Endometrite: in B si nota una doppia popolazione di granulociti neutrofili, maturi (R3) e band (R4).

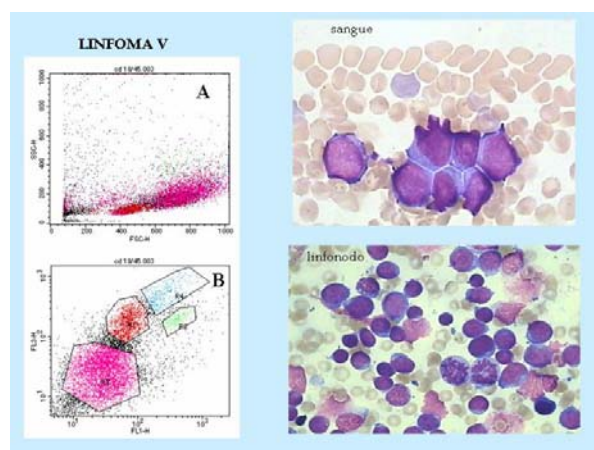


Figura n°3. Linfoma stadio V.

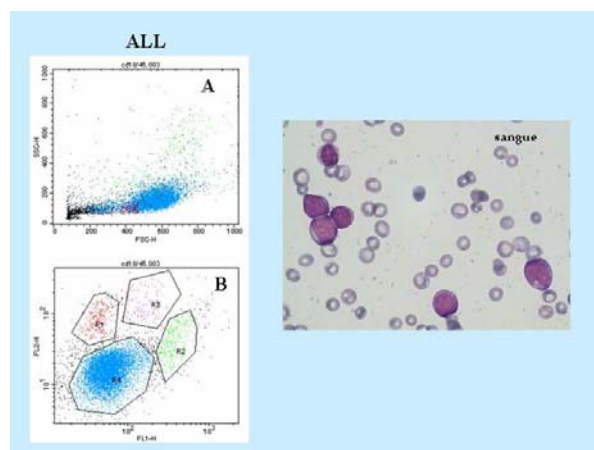


Figura n°4. Leucemia linfocitica acuta.

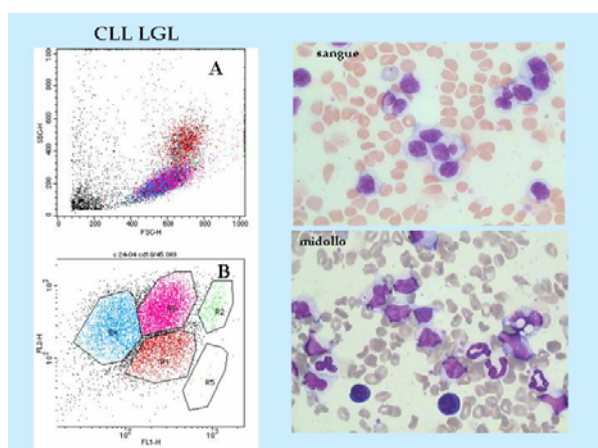


Figura n°5. Leucemia linfocitica cronica LGL.

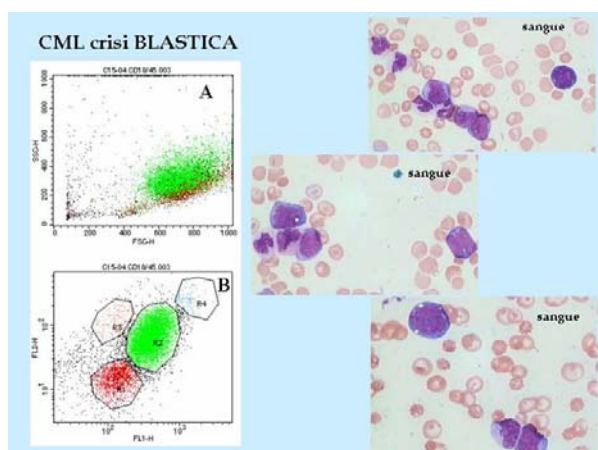


Figura n°6. Leucemia mieloide cronica in crisi blastica.

Discussione

I risultati ottenuti sembrano confermare come l'utilizzo contemporaneo degli anticorpi anti-CD18 e anti-CD45 permetta di differenziare le classi di leucociti ematici, in condizioni normali. Il confronto con le formule manuali ha evidenziato una buona correlazione tra le due metodiche, considerando la notevole differenza nel numero di cellule contate dal citofluorimetro e dagli operatori, nonostante vi fosse una tendenza alla sovrastima dei linfociti e ad una sottostima dei neutrofili nel conteggio, probabilmente dovuta alla distribuzione delle cellule nello striscio: i linfociti tendono, infatti, a disporsi nel centro dello striscio, a differenza dei neutrofili, spesso più numerosi ai margini e sulla coda, dove ci si sofferma meno quando si esegue la formula leucocitaria. L'utilità di questa metodica si è resa evidente nell'analisi dei casi patologici: la tendenza delle sottopopolazioni neoplastiche a

sottoesprimere uno o entrambi gli antigeni ha permesso di differenziare le cellule patologiche, sulle quali estendere l'analisi, dalla popolazione normale e si è quindi dimostrato utile soprattutto quando le caratteristiche morfologiche, evidenziate con FSC/SS, erano sovrapponibili.

Conclusioni

La valutazione dell'espressione degli antigeni CD18 e CD45 nei leucociti ematici di cane si è rivelata un metodo utile per distinguere le sottopopolazioni in modo più preciso rispetto al solo utilizzo di FSC/SS. In particolare, con solo due anticorpi monoclonali, si è potuto discriminare tra cellule leucemiche e cellule normali e focalizzare quindi l'attenzione su sottopopolazioni anomale, anche quando presenti in basse percentuali.

Bibliografia

1. Basso G., Buldini B., De Zen L., Orfao A.: New methodological approaches for immunophenotyping acute leukemias, *Haematologica* 86, 675-692 (2001)
2. Danilenko DM., Moore PF., Rossitto PV.: canine leukocyte cell adhesion molecules (LeuCAMs): characterization of the CD11/CD18 family, *Tissue antigens* 40, 13-21 (1992)
3. Hendrickx A., Bossuyt X.: Quantification of the Leukocyte Common Antigen (CD45) in mature B-cell malignancies, *Cytometry* 46, 336-339 (2001)
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=600065>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/cd45/cd45.html>
6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/9409305_21_g.htm,
7. Lacombe F., Durrieu F., Briais A., Dumain P., Belloc F., Bescans E., Reiffers J., Boisseau MR., Bernard Ph.: Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia, *Leukemia* 11, 1878-1886 (1997).
8. Weiss DJ.: Use of monoclonal antibodies to refine flow cytometric differential counting of canine bone marrow cells, *American Journal of veterinary research* 62, 1273-1278 (2001)
9. Weiss DJ., Welle M., Mortiz A., Walcheck B.: evaluation of leukocyte cell surface markers in dog with septic and nonseptic inflammatory diseases, *American Journal of veterinary research* 65, 59-63 (2004)

ESAME CITOLOGICO DI UN NODULO SOTTOCUTANEO IN UN GATTO

Ghisleni Gabriele, Roccabianca Paola, Caniatti Mario

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria - Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano

Riassunto

Un gatto Comune Europeo maschio di 12 anni veniva sottoposto a visita clinica, presso il Dipartimento di Clinica Chirurgica, per la presenza di un singolo nodulo sottocutaneo localizzato lateralmente alla coscia. Il nodulo era duro, non dolente, ben circoscritto, non adeso ai piani sottostanti ed alla cute. Veniva eseguita un'aspirazione mediante ago sottile del nodulo e il campione sottoposto ad esame citologico. Il campione presentava una popolazione infiammatoria mista, costituita principalmente da cellule linfoidi, plasmacellule, macrofagi, eosinofili e cellule giganti multinucleate.

La popolazione mista di cellule linfoidi era composta principalmente da piccoli e medi linfociti in presenza di un elevato numero di voluminose cellule linfoidi contenenti granuli citoplasmatici viola (linfociti granulari). Frammista a questa popolazione cellulare era rilevata la presenza di uova di parassita.

Il quadro citologico era compatibile con una flogosi granulomatosa in risposta alla presenza di nematodi. Il nodulo è stato sottoposto ad esame istologico, che ha evidenziato numerosi nematodi adulti circondati da una grave reazione infiammatoria granulomatosa multinodulare.

Sulla base della localizzazione e delle loro caratteristiche morfologiche i parassiti erano stati identificati come appartenenti alla famiglia dei Filaridae.

Parole chiave: gatto, citologia, nodulo parassitario sottocutaneo.

Summary

Cytological investigation of a subcutaneous nodule in a cat. A 12-years old neutered male Domestic Short Haired cat was presented to the Department of Veterinary Surgery with a history of rapid development of a single, subcutaneous nodule involving the lateral left thigh. The nodule was firm, non painful, well circumscribed, freely movable under the intact overlying skin. A fine-needle aspirate of the nodule was submitted for cytologic evaluation. The smears contained a mixed inflammatory cell population that consisted mostly of lymphoid cells, plasma cells, macrophages, eosinophils and multinucleated giant cells.

The mixed population of lymphoid cells was composed by a majority of small and medium sized lymphocytes with presence of elevated numbers of large immature granular lymphoid cells. Admixed with the lymphoid population several parasite eggs were found.

The cytologic interpretation was granulomatous inflammatory response to the presence of nematodes. The nodule was submitted for histologic examination. The subcutis contained multiple granulomas with intralesional nematode parasites. The numerous adult parasites were surrounded by a severe multinodular inflammatory reaction.

Based on the location of the adult worm and morphological characteristics of nematodes in tissue section a filarial nematode was the most likely origin.

Key words: cat, cytology, subcutaneous parasite nodule.

CALCIFICAZIONE DEI CUSCINETTI PLANTARI IN UN GATTO CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

Carli Andrea, Pisani Guido*, Chiodo Lorenza*, Gregori Michela*, Abramo Francesca**

° Libero Professionista, Mollicciara, La Spezia

*Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Pisa, Pisa

Riassunto

La calcificazione metastatica è un fenomeno di mineralizzazione extrascheletrica legato ad un disordine dell'omeostasi del Ca/P ed è rilevabile in pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) ed iperparatiroidismo secondario. Le calcificazioni si manifestano in forma generalizzata pluriviscerale, con interessamento primario di apparato cardiocircolatorio, rene, polmoni e mucosa gastrica. Viene riportato il caso di un gatto femmina di 11 anni con diagnosi clinica di calcinosi cutanea dei cuscinetti e IRC. All'esame radiografico si rilevavano radioopacità a carico di aorta e sue ramificazioni, della porzione cartilaginea delle coste e dell'omero. Il soggetto veniva a morte spontaneamente per insufficienza cardiaca. All'esame post mortem un rene appariva ridotto di volume e fibrotico, l'arco aortico e l'aorta addominale risultavano mineralizzati. L'esame istologico ha evidenziato infiltrato cronico interstiziale diffuso, fibrosi, glomerulocisti, cast proteinacei tubulari e depositi di calcio. Placche calcifiche erano anche presenti nelle pareti vasali e nell'endocardio. Nei cuscinetti plantari dei quattro arti era presente una dermatite granulomatosa con depositi di calcio. I reperti di mineralizzazione e di calcinosi dei cuscinetti, in un gatto con gravi alterazioni renali, suggeriscono l'esistenza di una associazione tra IRC e calcificazione metastatica; in particolare le lesioni dei cuscinetti possono essere inquadrare come manifestazione locale del fenomeno metastatico in aree soggette a traumi di tipo fisico. La calcinosi cutanea dei cuscinetti è di scarso valore prognostico in quanto quasi sempre rilevabile nelle fasi tardive della malattia. Analisi ematochimiche, radiologiche e la valutazione del danno renale sono indispensabili per l'impostazione di una eventuale terapia.

Parole chiave: Calcinosi circumscripta, cuscinetti plantari, gatto, insufficienza renale cronica

Summary

Footpad calcinosis in a cat with chronic renal failure. Metastatic calcification is a widespread extraskeleton mineralisation often involving the cardiovascular system, kidneys and gastric mucosa in animals with chronic renal failure (CRF) and disturbances of calcium and phosphorus homeostasis. A case of cutaneous calcinosis of the footpads in a 11-year-old cat with CRF is described. Thoracic and abdominal radiographs showed diffuse radiodensities involving the aortic silhouette, cartilaginous tracts of the ribs and humerus. Shortly afterwards the animal died for heart failure. At post-mortem examination marked shrinkage of one kidney, compensatory hypertrophy of the other and aortic mineralizations were detected. Histopathology revealed diffuse interstitial chronic infiltrates, glomerular microcysts, fibrosis and tubular proteinaceous casts in kidneys. Multiple calcified plaques in the tunica media of aorta and a granulomatous pododermatitis with calcium deposits were also detected.

The clinical and histopathological findings suggest a correlation between diffuse soft tissue calcifications and renal failure; footpad calcinosis should be considered a dystrophic process (tissue damage) triggered by a metastatic calcium and phosphorus imbalance. Footpad calcinosis as diagnostic finding is usually detectable during the late phase of the renal disease and therefore is of poor prognostic value. Laboratory analysis to evaluate the stage of the disease are necessary for a possible therapeutic approach.

Key words: Calcinosis circumscripta, cat, paw calcifications, chronic renal failure.

SINDROME EPATO-CUTANEA NEL CANE

Albanese Francesco, Cantile Carlo*, Abramo Francesca**

° Libero Professionista, Napoli

Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Pisa

Riassunto

La sindrome epato-cutanea (SEC) o necrosi metabolica dell'epidermide è una malattia dalla patogenesi complessa e multifattoriale descritta nell'uomo, cane, gatto e rinoceronte nero. Le lesioni dermatologiche (eritema, croste e ulcere) presenti su cuscinetti, area periorale/perioculare, genitali e punti di pressione, sono la conseguenza di una malattia epatica sottostante o, come prevalentemente segnalato nell'uomo e più raramente nel cane, di una malattia pancreatica. Nonostante l'incidenza cospicua delle malattie epatiche e pancreatiche nella popolazione canina solo in pochi casi tali malattie si manifestano anche con SEC. Questo rilievo fa ipotizzare che solo peculiari alterazioni organiche e funzionali del fegato possano essere responsabili dei disordini metabolici alla base delle manifestazioni cutanee, e in particolar modo della diminuzione degli aminoacidi plasmatici, indotta dall'iperglucagonemia, e/o ipoalbuminemia. Riportiamo 3 casi di SEC nel cane in cui il fegato appariva di dimensioni ridotte, con nodosità multiple e di consistenza "soffice". Istologicamente si rilevavano aree diffuse di steatosi micro e macrovescicolare, degenerazione vacuolare, cisti a contenuto fluido non ematico e assenza di proliferazione della componente stromale. Nonostante le lesioni cutanee, caratterizzate da paracheratosi, edema intracellulare dello strato spinoso e iperplasia dello strato basale, rappresentino un buon marker per un sospetto di malattia epatica, la gestione terapeutica è comunque di difficile impostazione. In particolare, il rilievo di SEC, per le gravi ed estese lesioni degenerative a carico del parenchima epatico, è legato alla breve sopravvivenza dei soggetti colpiti (pochi mesi).

Parole chiave: cute, fegato, paracheratosi, sindrome epato-cutanea, steatosi.

Summary

Hepatocutaneous syndrome in dogs. Hepatocutaneous syndrome (HCS) or necrolytic epidermal dermatitis is a rare disease of the dog, cat and black rhinoceros with a multifactorial and complex pathogenesis. Dermatological lesions (erythema, crusts, ulcers) on footpads, perioral/periocular areas, genitals and pressure points are a consequence of an underlying hepatic disorder or, mainly documented in humans and more rarely in dogs, of a pancreatic disease. Even if hepatic and pancreatic disorders are quite common in feline and canine populations only rarely these diseases manifest with HCS. This observation suggests that only a few structural and functional liver alterations could be responsible for the biochemical and dermatological alterations. We describe 3 cases of HCS in dogs where livers were smaller, soft and showed several nodules protruding on the surface. Histologically there were diffuse micro/macrovacular steatosis, vacuolar degeneration, fluid filled cysts, absence of stromal proliferation. Dermatohistopathology is strictly diagnostic for the disease (basal hyperplasia, vacuolar degeneration of the spinous layer, diffuse parakeratosis), nevertheless the therapeutic protocol is often ineffective due to the diffuse liver damage, the prognosis is usually poor (a few month survival).

Keywords: hepatocutaneous syndrome, liver, parakeratosis, skin, steatosis.

***MORFOMETRIA NUCLEARE NELLE EPULIDI ACANTOMATOSE E NEI
CARCINOMI SQUAMOSI DELLA GENGIVA NEL CANE***

Martano Manuela, Restucci Brunella, Paciello Orlando, Maiolino Paola*

Dipartimento di Patologia e Sanità Animale – Settore di Anatomia Patologica
Facoltà di Medicina Veterinaria - *Facoltà di Scienze Biotechologiche
Università degli Studi di Napoli- Federico II

Riassunto

Le epulidi acantomatose del cane, a differenza delle altre epulidi, nonostante l'aspetto istologico benigno, hanno un comportamento biologico maligno (Thrall e coll.,1981; Thrall,1984). Nel tentativo di spiegare ciò, abbiamo valutato alcuni parametri morfometrici indicatori del pleomorfismo nucleare in 8 epulidi acantomatose, di cui 4 hanno mostrato atipie cellulari. I valori ottenuti sono stati correlati con quelli di 13 carcinomi squamosi gengivali. La morfometria nucleare è stata effettuata mediante un sistema computerizzato di analisi di immagine. Per ogni caso sono stati delimitati con il mouse 100 nuclei, che sono stati sottoposti ad analisi morfometrica, valutandone l'area, il perimetro, il diametro massimo e minimo e il fattore di forma. Quattro delle otto epulidi acantomatose osservate, mostravano valori medi dell'area, del perimetro e del diametro minimo dei nuclei più bassi rispetto ai carcinomi squamosi con differenze altamente significative ($p < 0.006$; $p < 0.009$; $p < 0.004$), mentre i valori del diametro massimo tendevano ad uguagliarsi ($p = 0.93$). Le 4 epulidi che presentavano atipie cellulari esibivano valori medi di area e di perimetro più alti delle altre e molto simili a quelli riscontrati nei carcinomi squamosi; infatti le differenze con questi ultimi non erano statisticamente significative ($p > 0.01$). Il fattore di forma non evidenziava nessuna differenza statisticamente significativa ($p > 0.01$). I risultati ottenuti hanno evidenziato un progressivo aumento delle dimensioni nucleari nel passare dalle gengive normali alle epulidi e ai carcinomi squamosi. Inoltre, nelle epulidi con atipie cellulari la valutazione media dell'area e del perimetro tendeva ad uguagliare quella dei carcinomi, indicando una stretta somiglianza morfologica dei nuclei tra queste 2 lesioni. Concludendo, gli Autori suggeriscono di considerare le epulidi acantomatose del cane come lesioni neoplastiche

maligne o potenzialmente maligne e confermano l'importanza della morfometria nucleare come valore diagnostico e soprattutto prognostico anche nelle patologie della cavità orale del cane.

Parole chiave: morfometria, epulidi acantomatose, carcinomi squamosi, cane.

Summary

Nuclear morphometry in acanthomatous epulides and squamous cell carcinomas of canine gingiva. The acanthomatous epulis, in contrast to other epulides, shows a benignant histopathological pattern and a malignant biologic behaviour. To explain this behaviour, we calculated, in 8 acanthomatous epulides, some morphometric nuclear parameters (area, perimeter, maximum and minimum diameters and form factor), by means of an automated image analyser. The morphometric data were examined in relation to squamous cell carcinomas of canine gingiva. 8 acanthomatous epulides and 13 squamous cell carcinomas were examined. The results indicated a progressive increase of mean value of nuclear area, perimeter and minimum diameters from normal gingivas and acanthomatous epulides to squamous cell carcinomas, with an high level of significance ($p < 0.006$; $p < 0.009$; $p < 0.004$). Moreover, nuclear parameters (area and perimeter) resulted similar in epulides with cellular atypia and in squamous cell carcinomas ($p > 0.01$). In conclusion, acanthomatous epulis could be considerate malignant or potential malignant lesions. Thus, the results indicate that nuclear morphometry analysis may be regarded as useful diagnostic and prognostic parameters also in canine oral pathology.

Key words: morphometry, acanthomatous epulides, carcinomas, dog.

Introduzione

Con il termine epulide, stando al significato etimologico della parola, dovrebbe intendersi ogni proliferazione a sede gengivale, sia essa di natura infiammatoria o neoplastica, benigna o maligna, congenita o acquisita (Lanza, 1985). Da sempre, però, tale termine viene usato per indicare un gruppo di lesioni neoplastiche, per lo più benigne e molto frequenti nel cane e nel gatto, che sulla base dei criteri istologici (Baker, 1993), vengono suddivise in : epulide fibromatosa, ossificante (oggi anche detta fibroma odontogenico periferico) (Gardner, 1991), e acantomatosa

(meglio conosciuta come ameloblastoma acantomatoso del cane ed identificata con l'ameloblastoma periferico dell'uomo) (Gardner, 1993). A differenza delle altre epulidi, l'epulide acantomatosa, nonostante l'aspetto istologico benigno (non vengono riportate atipie cellulari) ha un comportamento biologico maligno; è infatti localmente invasiva e distruttiva e frequentemente recidiva dopo l'escissione chirurgica (Bostock, 1987). E' inoltre riportata la possibile trasformazione di questa in carcinoma squamoso quando invade l'osso e in seguito a terapia radiante (Thrall e coll., 1981, Thrall, 1984). Nel tentativo di dare una spiegazione a tale comportamento ci è sembrato opportuno valutare, in un gruppo di epulidi acantomatose, alcuni parametri morfometrici indicatori del pleomorfismo nucleare e precisamente l'area nucleare media (ANM), il perimetro (PNM), il diametro massimo (DMx) e minimo (DMn), che indicano la rotondità o l'ellitticità del nucleo e il fattore di forma (FF) che indica la presenza o l'assenza di dentellature nucleari. Tali valori sono stati correlati con quelli dei carcinomi squamosi della gengiva nel cane.

Materiali e metodi

Sono state esaminate 2 gengive normali, 8 epulidi, classificate come acantomatose e 13 carcinomi squamosi della gengiva del cane fissati in formalina al 10% e inclusi in paraffina. Da ciascun campione sono state ottenute sezioni di 4µm, colorate con ematossilina-eosina. La morfometria nucleare è stata effettuata sulle sezioni colorate con ematossilina-eosina mediante un sistema computerizzato di analisi di

immagine (Sistema Mono, Immagine e Computer, Milano) selezionando randomicamente e a piccolo ingrandimento (x10), per ogni caso, 10 aree. Le immagini accumulate nella memoria del computer sono state richiamate sul monitor e in ogni area, a forte ingrandimento (40 X), dopo aver delimitato con il mouse almeno 100 nuclei mediante la funzione "Draw/Marge object" del software di analisi, sono stati calcolati i seguenti parametri nucleari: ANM, PNM, DMx, DMn e FF. I dati ottenuti sono stati correlati mediante analisi della varianza (ANOVA), con quelli dei carcinomi squamosi.

Le epulidi acantomatose risultavano morfologicamente costituite da lamine, cordoni o isole di cellule epiteliali squamose disposte con il loro asse perpendicolare alla membrana basale nel tipico aspetto "a palizzata". I nuclei delle cellule basali (dette così perché poste alla periferia e a contatto con la membrana basale) erano posti al polo opposto rispetto alla membrana basale. Ben evidenti erano i ponti intercellulari e l'edema intra ed intercellulare che favoriva l'evidenziazione dei ponti (Figura 1).

In tutti i casi da noi esaminati e diagnosticati come epulidi acantomatose, la proliferazione risultava essere in continuità con l'epitelio sovrastante ed in alcuni tratti, sembrava prendere origine da esso. In 4 delle 8 epulidi si osservavano aree con evidenti atipie cellulari e frequenti mitosi (Figura 2).

In nessuna delle epulidi da noi esaminate la proliferazione cellulare invadeva l'osso sottostante.

I carcinomi squamosi, a differenza delle epulidi, risultavano costituiti da numerosi nidi infiltranti di cellule squamose con evidenti caratteri di malignità (Figura 3), nell'ambito dei quali frequente era la presenza delle tipiche perle cornee, mentre mancavano le cellule a palizzata. Costante era l'invasione dell'osso sottostante.

Risultati

I risultati sono riportati nelle tavole 1 e 2.

Le gengive normali così come le epulidi acantomatose mostravano valori medi della area e del perimetro più bassi (ANM:35,77±6,02; PNM:21,97±1,96 e ANM:41,40±8,45; PNM:24,18±2,68 rispettivamente) dei carcinomi squamosi (ANM:50,99±8,16; PNM:25,63±2,54)

con differenze significative ($p < 0.01$). Le 4 epulidi che presentavano aree con evidenti atipie cellulari esibivano valori medi dell'area più alti (ANM: $49,01 \pm 6,88$) delle altre (ANM: $35,22 \pm 2,07$;) e molto simili a quelli riscontrati nei carcinomi squamosi (ANM: $50,99 \pm 8,16$;) infatti le differenze con questi ultimi, risultavano non essere significative ($p > 0.01$). I valori medi del diametro minimo tendevano ad aumentare più o meno progressivamente passando dalle epulidi (DMn $5,69 \pm 0,49$) ai carcinomi squamosi (DMn $6,64 \pm 0,73$) con differenze altamente significative ($p < 0.001$), mentre quelli del diametro massimo (DMx $9,27 \pm 1,19$ e DMx $9,23 \pm 1,12$ rispettivamente per le epulidi e per i carcinomi) tendevano ad uguagliarsi ($p = 0.93$). Le 4 epulidi atipiche mostravano comunque valori medi del perimetro, del diametro massimo e del fattore di forma più alti (PNM: $26,28 \pm 1,99$; DMx $10,18 \pm 0,88$; FF: 1.14 ± 0.005) dei carcinomi squamosi (PNM: $25,63 \pm 2,54$; DMx $9,23 \pm 1,12$; FF: 0.91 ± 0.38), anche se non si evidenziava nessuna differenza statisticamente significativa ($p > 0.01$).

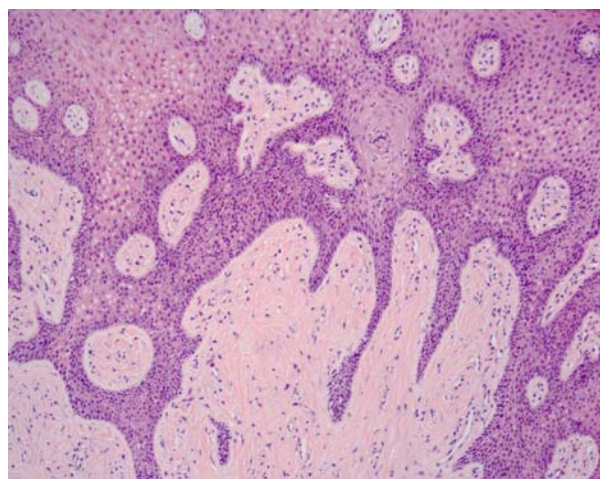


Figura 1: Epulide acantomatosa : lamine di cellule epiteliali squamose in continuità con l'epitelio sovrastante, disposte nel tipico aspetto "a palizzata". Ematossilina-eosina. 20 X.

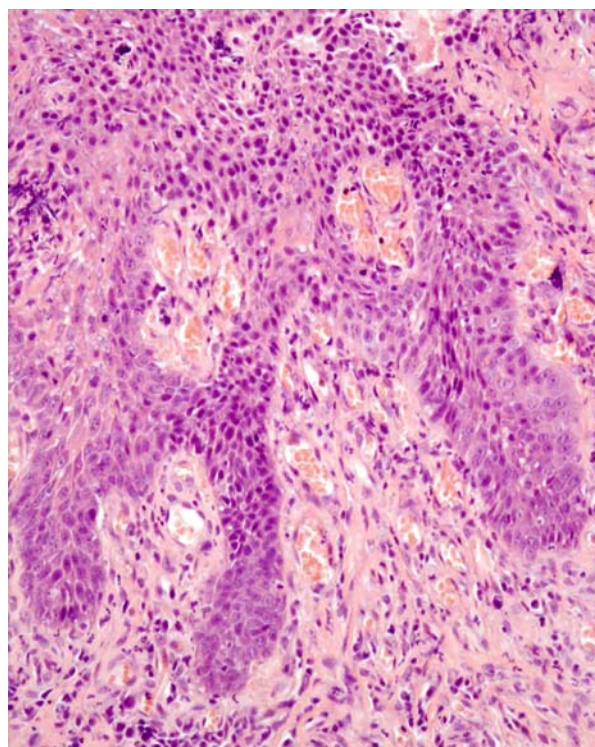


Figura 2: Epulide acantomatosa "atipica": aree con evidenti atipie cellulari, perdita della polarità delle cellule basali. Ematossilina-eosina. 20 X.

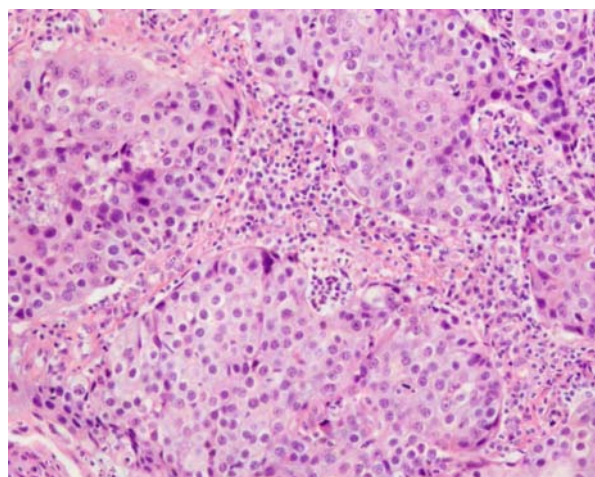


Figura 3: Carcinoma squamoso : nidi di cellule epiteliali squamose con evidenti caratteri di malignità. Ematossilina-eosina. 20 X.

Parametri	Valori *	
	Epulidi	Carcinomi
ANM (μm^2)	41.40 \pm 8.45 (33.35-56.22)	50.99 \pm 8.16 (33.25-63.85)
PNM (μm)	24.18 \pm 2.68 (21.34-28.22)	25.63 \pm 2.54 (21-28.86)
DMx	9.27 \pm 1.19 (7.97-10.87)	9.23 \pm 1.12 (7-10.71)
DMm	5.69 \pm 0.49 (5.23-6.61)	6.64 \pm 0.73 (5-8.07)
FF	1.13 \pm 0.02 (1.1-1.18)	0.91 \pm 0.38 (1-1.40)

Tavola 1 - Valori medi dei parametri nucleari morfometrici nelle epulidi acantomatose e nei carcinomi squamosi della gengiva del cane. *Media \pm Deviazione standard (range in parentesi).

Para- metri	Valori *		
	Epulidi tipiche	Epulidi atipiche	Carcinomi
ANM (μm^2)	35.22 \pm 2.07 (35.3-38.01)	49.01 \pm 6.88 (42.07--56.22)	50.99 \pm 8.16 (33.25-63.85)
PNM (μm)	22.08 \pm 1 (21.34-23.54)	26.28 \pm 1.99 (24.26-28.22)	25.63 \pm 2.54 (21-28.86)
DMx	8.37 \pm 0.70 (7.97-9.26)	10.18 \pm 0.88 (9.27-11)	9.23 \pm 1.12 (7-10.71)
DMm	5.30 \pm 0.05 (5.23-5.35)	6.08 \pm 0.41 (5.7-.6.61)	6.64 \pm 0.73 (5-8.07)
FF	1.12 \pm 0.03 (1.1-1.18)	1.14 \pm 0.005 (1.14-1.15)	0.91 \pm 0.38 (1-1.40)

Tavola 2-Valori medi dei parametri nucleari morfometrici nelle epulidi acantomatose tipiche e atipiche e nei carcinomi squamosi. *Media \pm Deviazione standard (range in parentesi).

Discussione e conclusione

I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento progressivo delle dimensioni nucleari nel passare dalle gengive normali, alle epulidi e ai carcinomi squamosi. Inoltre, nelle 4 epulidi con aree atipiche la valutazione media dell'area tendeva ad uguagliare quella dei carcinomi mentre una

differenza sembrava essere evidenziata dal perimetro, dal diametro massimo e dal fattore di forma che, nelle epulidi, mostravano valori medi più alti indicando così un cambiamento della forma e soprattutto un aumento nel senso della lunghezza dei nuclei rispetto ai carcinomi squamosi.

I risultati ottenuti richiamano l'attenzione degli istopatologi sulle epulidi acantomatose del cane, suggerendo di considerare queste come lesioni neoplastiche maligne o potenzialmente maligne e sembrano altresì confermare il valore diagnostico e soprattutto prognostico della morfometria nucleare nelle epulidi acantomatose del cane.

Bibliografia

1. Baker IK, Van Dreumel AA, Palmer N: The alimentary system. In : Pathology of Domestic Animals, ed. Jubb KVF, Kennedy PC, and Palmer N., IV Edizione, vol.2, pp.21-30. Academy Press, San Diego, CA, 1993.
2. Bostock DE, White RA. (1987). Classification and behaviour after surgery of canine 'epulides'. *J Comp Pathol.* , **97** (2), 197-206.
3. Gardner DG, Baker DC. (1991). Fibromatous epulis in dogs and peripheral odontogenic fibroma in human beings: two equivalent lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* , **71**(3):317-21.
4. Gardner DG, Baker DC. (1993). The relationship of the canine acanthomatous epulis to ameloblastoma. *J Comp Pathol.* , **108** (1):47-55.
5. Lanza G. Anatomia Patologica Sistemica II Edizione. Piccin, 1985.
6. Thrall DE, Goldschmidt MH, Biery DN. (1981). Malignant tumor formation at the site of previously irradiated acanthomatous epulides in four dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, **178**(2):127-32.
7. Thrall DE. (1984). Orthovoltage radiotherapy of acanthomatous epulides in 39 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* , **184**(7):826-9.

**L'ANALISI AD IMMAGINE NELLA VALUTAZIONE DEL KI-67 NEL
MASTOCITOMA CUTANEO CANINO PER LA SOTTOTIPIZZAZIONE DEL
GRADO ISTOLOGICO**

Petterino Claudio, Castagnaro Massimo

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, AGRIPOLIS,
Viale dell'Università, 16, Legnaro (PD)

Riassunto

I mastocitomi sono una frequente neoplasia maligna della cute nel cane, potenzialmente metastatica in funzione di definiti fattori prognostici. Il grading istologico fornisce preziose informazioni prognostiche che sono utili ai medici clinici al fine di definire un adeguato trattamento adattabile a ciascun caso clinico. I parametri istologici comunemente utilizzati per valutare il grado istologico comprendono: la cellularità, il tipo cellulare, la presenza di cellule giganti, il pleomorfismo, la presenza di granuli citoplasmatici, l'aspetto dei nuclei e, l'indice mitotico. Recentemente, è stato riportato che il Ki-67 potrebbe essere un utile marker per differenziare i mastocitomi di I e II grado rispetto a quelli di III. Questo studio valuta mediante l'analisi ad immagini l'immunoreattività per l'antigene Ki-67 nei mastocitomi cutanei canini. L'immunocolorazione del Ki-67 è stata realizzata mediante metodica immunoistochimica in 30 campioni tissutali. La valutazione del numero di cellule positive è stata valutata mediante l'analisi ad immagini. Differenze statisticamente significative sono state osservate tra i mastocitomi di II grado versus i mastocitomi di I e II grado. L'analisi ad immagini si è inoltre dimostrata una rapida e facile metodica per la valutazione del numero di nuclei positivi al fine di definire, più correttamente, il grado istologico delle lesioni neoplastiche considerate.

Parole chiave: mastocitoma cutaneo, cane, ki-67, grado istologico.

Summary

Image analysis in the evaluation of ki-67 in cutaneous canine mast cell tumours to subtyping histologic grade. Mast cell tumours are a common malignant skin tumour in dogs,

with potential for metastases depending on a number of defined prognostic factors. Histopathologic grading provides prognostic information that is used by clinicians to develop treatment recommendations for any clinical case. The histologic parameters commonly used to evaluate the histologic grade comprise: cellularity, cell type, presence of giant cells, pleomorphism, cytoplasmic granules, nuclei aspects and, mitotic index. Recently, has been reported that Ki-67 could be useful marker to differentiate I and II grade mast cell tumour in comparison to III grade mast cell tumour. This study evaluates by image analysis the immunohistochemistry reactivity of Ki-67 antigen in canine cutaneous mast cell tumours. The immunolabelling of Ki-67 was performed by immunohistochemistry method in 30 tissue samples. The evaluation of the positive number cells was evaluated by image analysis. A statistical significant differences were observed between II grade mast cell tumor versus I and III grade tumour. The image analysis was an easy and rapid methods to count positive nuclei and define a histologic grade of the neoplastic lesions.

Key-words: cutaneous mast cell tumour, dog, ki-67, histologic grade.

Introduzione

Il mastocitoma rappresenta la più frequente neoplasia cutanea osservata nel cane con percentuali variabili a seconda dell'autore dall'8.8% al 15% (Conroy, 1983; Walzer, 1992). Lo studio del ki-67 ha già dimostrato per molte altre neoplasie un'importanza fondamentale nel fornire informazioni sulla prognosi o la sua correlazione con il grado istologico in altre neoplasie come linfoma (Fournel-Fleury et al., 1997, Ponce et al., 2003; Philips et al., 2000), tumore mammario canino (Perez-Alenza, et al.,

2000; Pena et al., 1998), neoplasie dei corpi aortici e carotidi (Brown et al., 2003) e, melanoma maligno (Millanta et al., 2002). Sulla base del fatto che spesso non esiste concordanza nel definire il grado istologico dei mastocitomi cutanei (Northrup et al., 2003), lo studio del ki-67 index in questa neoplasia potrebbe fornire utili informazioni nel rendere più oggettiva la definizione del grado istologico. A tal fine l'impiego dell'analisi ad immagini potrebbe ulteriormente facilitare la valutazione quantitativa dei preparati immunohistochimici.

Materiali e metodi

Il presente studio è stato condotto su prelievi di noduli cutanei provenienti da 30 soggetti di specie canina aventi un'età compresa tra i 5 e i 14 anni. I tessuti, fissati in formalina, sono stati successivamente ridotti ed inclusi in paraffina e da essi, allestiti i vetrini colorati con EE. Le lesioni sono state classificate secondo i criteri diagnostici della WHO. Per l'indagine immunohistochimica è stata utilizzata una procedura standard utilizzando l'anticorpo primario monoclonale anti-Ki-67 clone MIB1 (Zymed Laboratories Inc.) diluito 1:50 in PBS e, come anticorpo secondario anti-mouse il sistema EnVision+™ Peroxidase (DAKO). Per la reazione di visualizzazione è stato utilizzato il cromogeno 3,3' diaminobenzide tetraidrocloruro (Vector Laboratories, Inc.) e per la controcolorazione l'ematossilina di Harry. Come controllo positivo è stata considerata l'immunopositività nucleare delle cellule dello strato basale epidermico. I controlli negativi sono stati processati sostituendo l'incubazione con anticorpo primario con una soluzione di BSA 2.5 % in PBS.

La valutazione dell'espressione di Ki-67 è stata eseguita valutando la percentuale di cellule positive in 10 campi microscopici a 400 ingrandimenti sia mediante normale conta ottica, che utilizzando il programma per analisi di immagini Image Pro-Plus (Media Cybernetics).

Risultati

Dei 30 casi esaminati 10 casi sono stati classificati come mastocitoma di I grado (Ki67-index CM [Conta Manuale] = $2,038 \pm 1,344$; CAi [Conta Analisi immagini] = $3,070 \pm 1,121$), 10 di II grado (Ki67-index CM = $10,234 \pm 3,154$; CAi =

$12,051 \pm 1,957$) e, 10 di III grado (Ki67-index CM = $19,518 \pm 3,351$; CAi = $20,874 \pm 2,941$). La positività è stata osservata unicamente a livello nucleare. I dati relativi alle differenze statistiche fra i differenti gradi di mastocitomi e le correlazioni fra i due tipi di lettura sono indicati nelle tabelle 1 e 2. Nel complesso il sistema di lettura si è dimostrato significativamente importante nel definire la % di cellule positive nei casi esaminati, rispetto alla conta manuale (P = 0,014).

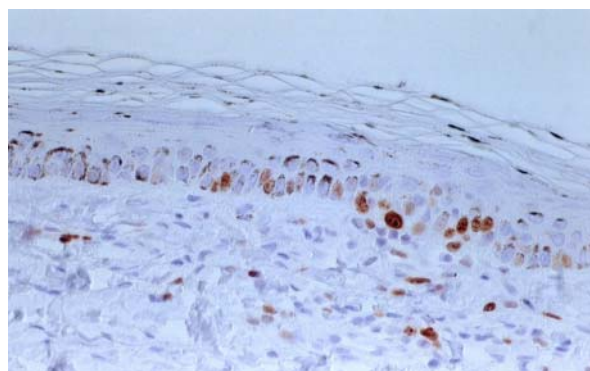


Figura 1 – Controllo positivo (X 400).



Figura 2 – Scarsi nuclei positivi per Ki-67 in un mastocitoma di I grado (X400).

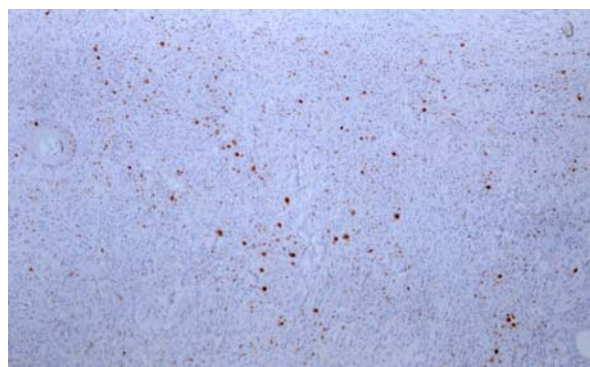


Figura 3 – Moderato numero di nuclei positivi per Ki-67 in un mastocitoma di II grado (X400).

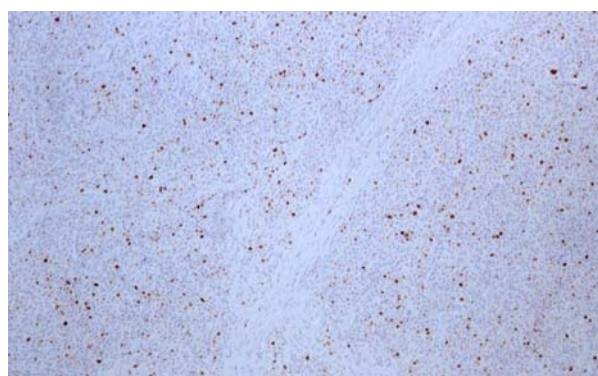


Figura 4 – Elevato numero di nuclei positivi per Ki-67 in un mastocitoma di III grado (X100).

Confronti	CM	CAi
MCT I° vs MCT II°	< 0.001	< 0.001
MCT II° vs MCT III°	< 0.0001	< 0.0001
MCT I° vs MCT III°	< 0.0001	< 0.001

Tabella 1 – Differenze statisticamente significative per % di cellule Ki-67 positive fra i differenti gradi istologici. MCT = Mast Cell Tumour.

	CM vs CAi	
MCT I°	R = 0,348	P = 0,324
MCT II°	R = 0,806	P < 0.001
MCT III°	R = 0,864	P < 0.001

Tabella 2 – Correlazioni statistiche per mastocitomi di differenti gradi considerando due differenti sistemi di lettura. MCT = Mast Cell Tumour

Discussione

Sulla base sia dei dati bibliografici attualmente disponibili il ki-67 si è dimostrato nel mastocitoma cutaneo canino un ottimo marker nel definire il livello di proliferazione cellulare (Sakai et al., 2002). Secondo Abadie e colleghi (1999) i casi con un numero di cellule ki-67 positive inferiore a 93/1000/hpf hanno una miglior sopravvivenza.

Nel presente lavoro abbiamo osservato una differenza significativa fra grado istologico e ki-67 index confermando quindi quanto già riportato in letteratura.

Il sistema ad analisi ad immagine ha consentito di valutare che effettivamente un metodo più oggettivo consente di meglio valutare il numero di cellule positive, in particolare nei mastocitomi di I grado. Ciò forse in base al fatto che la lettura

manuale può determinare maggiori probabilità di errore nella valutazione delle cellule positive e di quelle negative. Ciò consentirebbe da un lato di commettere meno errori interpretativi, dall'altro di ottenere informazioni più attendibili con minori difficoltà interpretative.

Bibliografia

1. Abadie, J.J., et al. (1999). Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *JAVMA*, 215: 1629-1634.
2. Brown, et al. (2003). Immunohistochemical characteristics of canine aortic and carotid body tumours. *J Vet Med A*, 30: 140-144.
3. Conroy, J. (1983). Canine skin tumors. *JAAHA*, 19: 91-114.
4. Fournel-Fleury, C., et al. (1997). Growth functions in canine non-Hodkin's lymphoma as determined in situ by expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Pathol*, 11: 61-72.
5. Millanta, F., et al. (2002). Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res Vet Sci*, 75: 45-51.
6. Northrup, C., et al., (2003). Variation among pathologists in histopathologic grading of canine mast cell tumors. Comunicazione personale.
7. Philips, B.S. et al. (2000). Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest*, 12: 111-117.
8. Pena, L.L., et al. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathological variables. *J Vet Diagn Invest*, 10: 237-246.
9. Perez-Alenza, M.D., et al. (2000). Factor influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 41: 287-291.
10. Ponce, F., et al. (2003). High-grade canine T-cell lymphoma/leukemia with plasmacytoid morphology: a clinical pathological study of nine of cases. *J Vet Diagn Invest*, 15: 330-337.
11. Sakai, H., et al. (2002). Proliferative activity of canine mast cell tumours. Evaluated by bromodeoyuridine incorporation and Ki-67 expression. *J Comp Pathol*, 127: 233-238.
12. Walder, E.J. (1992). Canine mast cell tumor. In *Veterinary Dermatology*, Gross, T.L., et al., 470-473.

**VALUTAZIONE MORFOMETRICA DI QUADRI ISTOPATOLOGICI GASTRICI
INDOTTI DA TRATTAMENTO IN STUDI PRECLINICI SU RATTO**

Chiusolo Arianna, Lanzoni Anna

Pathology Department, Safety Assessment, GlaxoSmithKline, Via Fleming, 4, Verona Italy

Riassunto

I quadri istopatologici gastrici osservati in studi preclinici di un nuovo composto su ratto sono stati caratterizzati utilizzando il metodo morfometrico. Le sezioni istologiche della porzione ghiandolare dello stomaco, colorate con ematossilina ed eosina, sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine. In particolare, e' stato valutato l'effetto del trattamento orale ed intravenoso sui principali tipi cellulari che caratterizzano la mucosa fundica dello stomaco (cellule principali e parietali). Tra i parametri classicamente utilizzati per la valutazione morfometrica della mucosa gastrica in condizioni normali e patologiche, sono stati selezionati il rapporto tra l'altezza della porzione ghiandolare e la corrispondente altezza totale della mucosa gastrica, il numero di cellule principali e parietali per unita' di area. La valutazione statistica (ANOVA test) dei dati raccolti ha evidenziato la riduzione delle popolazioni cellulari che caratterizzano la mucosa fundica e l'iperplasia rigenerativa della mucosa gastrica in seguito al trattamento. Tutti gli effetti osservati erano più marcati nei ratti trattati per via orale.

Questo studio ha quindi permesso di:

1. definire un metodo valido e di facile utilizzo per la valutazione delle modificazioni gastriche in ratti trattati con nuovi composti;
2. quantificare e caratterizzare, utilizzando questo approccio, le sopracitate modificazioni della mucosa gastrica.

Parole chiave. Morfometria, analizzatore d'immagine, stomaco, ratto.

Summary

Morphometric evaluation of drug induced gastric changes in rats from preclinical studies.

During preclinical studies, the treatment of rats with a new test compound caused gastric changes, which were evaluated by quantitative morphometry.

This investigation was performed on histologic sections of glandular stomach, stained with hematoxylin and eosin by an image analysis system. In particular, the effect of the treatment on the main epithelial cell types present in the fundic mucosa (chief and parietal cells) was studied.

Parameters were chosen among the classically used in morphometric evaluation of the gastric mucosa in normal and pathological conditions. Selected parameters were: ratio of the height of the glandular portion/total heights of the gastric mucosa, chief and parietal cells number/area.

Statistical evaluation (ANOVA test) of data collected provided evidence of fundic glandular cells reduction and regenerative hyperplasia of the gastric mucosa. All observed effects were prominent in orally dosed rats.

The present study allowed:

1. to define a suitable and the most effortless morphometric approach in order to investigate the gastric changes observed in the gastric mucosa from rats receiving the test compound;
2. to quantify by this morphometric approach the above mentioned modifications.

Keywords. Morphometry, image analysis, stomach, rat.

ANALISI FRATTALE DEL TRICOBLASTOMA “RIBBON TYPE” DEL CANE

*De Vico Gionata (1), Macrì Battesimo (1), Cataldi Marielda. (2), Maiolino Paola (2),
Beltraminelli Sandro (3), Losa Gabriele (4)*

- (1) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Polo Universitario dell'Annunziata, Viale Annunziata, 98168, Messina, Italia.
(2) Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Federico II, Napoli, Italia.
(3) Centro Sistemi Informativi, Bellinzona, Switzerland.
(4) Institute for Scientific Interdisciplinary Studies, Locarno, Switzerland.

Riassunto. Il Tricoblastoma rappresenta il 25% di tutti i tumori epiteliali della cute del cane. Tra le diverse varianti istologiche note, il “ribbon type” mostra un’architettura spesso estremamente complessa, che soggettivamente ricorda alcune strutture aventi caratteristiche frattali. In questo studio abbiamo voluto verificare se l’impressione soggettiva di auto-somiglianza che tali tumori sembrano possedere, fosse espressione di un effettivo accrescimento frattale, geometricamente e matematicamente determinabile. Gli oggetti frattali infatti rispondono a regole geometriche e matematiche diverse da quelle proprie della geometria Euclidea, la quale quindi risulta poco efficace nella loro descrizione e classificazione. 12 tricoblastomi Ribbon Type di cane, sono stati sottoposti ad esame immunistoichimico per l’evidenziazione delle citocheratine. Immagini multiple sono state acquisite e binarizzate opportunamente in modo da riprodurre esattamente il profilo disegnato dalla componente epiteliale neoplastica. Ogni profilo veniva sottoposto ad analisi frattale mediante FANAL++, un software che consente di individuare la regione frattale all’interno della curva bi-asintotica derivata dal metodo “Box-counting” per la determinazione della dimensione frattale. I risultati ottenuti hanno dimostrato che tutti i casi da noi esaminati hanno, entro i limiti calcolati dal FANAL++, una struttura frattale reale. I dati del FANAL++ non sono sempre comparabili con quelli ottenuti mediante BENOIT 1.3, un software di analisi frattale disponibile in commercio attualmente non equipaggiato per la determinazione della “finestra frattale”. I nostri risultati suggeriscono che l’analisi frattale può essere estremamente utile nella descrizione e classificazione del tricoblastoma del cane, sempre che tale analisi venga effettuata mediante metodi rigorosi di indagine.

Parole Chiave: Tricoblastoma; Analisi Frattale.

Summary. Fractal Analysis of canine “Ribbon Type” Trichoblastoma. Trichoblastoma represents about 25% of all canine epithelial skin tumours. Among the different histological types, the “ribbon type” subjectively displays a very complex structure, sometimes suggestive of a self-similar design and resembling some characteristics of fractal structures. We performed a fractal analysis of twelve canine trichoblastoma in order to test the effectiveness of the fractal approach for describing the epithelial architecture of this peculiar spontaneous canine tumour, and in view of a future fractal-based classification. The specimens were fixed in 10% formalin, processed for paraffin embedding and cytokeratin staining. A series of images were random systematically acquired and the outline of the epithelial component of each case successively segmented. The fractal analysis of all profiles was performed by means of FANAL++, a software which enabled to identify the fractal region within the bi-asymptotic curve achieved by the box counting method. All cases of canine trichoblastoma examined showed self-similarity and revealed a true fractal pattern of the epithelial component as documented by the experimental data. The FANAL++ results were not always comparable with those obtained on the same images by means of a commercially available software BENOIT 1.3, actually not implemented for the fractal windows recognition. These data indicate that a fractal analysis based on a *rigorous* approach may be useful for the histological classification of canine trichoblastoma.

Key Words: Trichoblastoma; Fractal Analysis.

INDICE

PRESENTAZIONI PLENARIE

Il ruolo del patologo veterinario nella patologia tossicologica e sperimentale. Jan Klapwijk, Patrizia Cristofori, **pag. 4-5.**

The role of Clinical Pathology in Veterinary Medicine. Archer Joy, **pag. 6.**

COMUNICAZIONI AIPVET

Nefroblastoma suino e bovino: aspetti istologici ed immunoistochimici. Grieco Valeria, Belotti S., Scanziani Eugenio, **pag. 7.**

Carcinoma ameloblastico acantolitico in un cavallo. Rondena Marco, Capitelli Raffaella, Vezzadini Lorenzo, Di Giancamillo Mauro, Roccabianca Paola, **pag. 8.**

Condrosarcoma mesenchimale cutaneo in un gatto. Romanucci Mariarita, Bongiovanni Laura, Petrizzi Lucio, Della Salda Leonardo, **pag. 9.**

Iperplasia e tumori dell'epitelio dei corpi ciliari: aspetti istologici ed immunoistochimici. Giudice Chiara, Ghisio Valeria, Rondena Marco, Parodi Margherita, Cammarata Giorgio, **pag. 10.**

Analisi della espressione di citochine in monociti bovini isolati. Pocacqua Vanessa, Giordano Alessia, Rinaldi Manuela, Cecilianì Fabrizio, Sartorelli Paola, **pag. 11-14.**

Attivazione in vitro di granulociti neutrofili di bovino: modificazione della densità e dell'espressione di integrine. Spagnolo Valentina, Giordano Alessia, Comazzi Stefano, Sartorelli Paola, **pag. 15-19.**

Risultati preliminari sulla risposta di fase acuta in gatti con sarcoma iniezione-indotto. Giordano Alessia, Bonafè Katia, Capitelli Raffaella, Grieco Valeria, Paltrinieri Saverio, **pag. 20-24.**

Studio sulla risposta immunitaria di suinetti vaccinati contro PRRSV ed infettati con ceppo italiano eterologo. Borghetti Paolo, De Angelis Elena, Cordioli Paolo, Alborali Loris G., Lombardi Guerino, Gozio Stefano, Corradi Attilio, Martelli Paolo, **pag. 25.**

Adesione e risposta adattativa cellule osteoblast-like (SaOS-2) cresciute su superfici di titanio diversamente trattate. Paolo Borghetti, De Angelis Elena, Caldara Gaetano, Corradi Attilio, Cabassi Enrico, Cacchioli Antonio, Gabbi Carlo, **pag. 26.**

Distribuzione anatomica di desmogleina 1-2 nell'epidermide di cane e gatto: indagine immunoistochimica. Miragliotta Vincenzo, Coli Alessandra, Podestà Adriano, Ricciardi Maria Paola, Abramo Francesca, **pag. 27.**

Effetti di una razione contaminata da FBI sulla risposta immunitaria in lattonzoli. Miduri Francesca, Passeri Benedetta, Cantoni Anna Maria, Dorigoni Vittorio, Cabassi Enrico, **pag. 28.**

Il "giro d'ispezione delle carni": nuova proposta didattica per l'insegnamento dell'ispezione carni. Ferretto Giulia, Possenti Elisa, Monaci Marzia, Perniceni Livio, Scanziani Eugenio, **pag. 29-31.**

Rilievi necroscopici, esami citologici, istologici e determinazione dei metalli pesanti e arsenico in tartarughe marine spiaggiate in Emilia-Romagna. Merendi Flavia, Zaccaroni Annalisa, Zucchini Marina, Affronte Marco, Scaravelli Dino, Simoni Paolo, **pag. 32-35.**

Lo xenotrapianto di rene da maiale transgenico per HDAF a Macaca fascicularis come modello preclinico: studio clinico-patologico in 31 primati. Cavicchioli Laura, Calabrese Fiorella, Valente Marialuisa, Cozzi Emanuele, Ancona Ermanno, Castagnaro Massimo, **pag. 36.**

Particelle atmosferiche ambientali nei polmoni dei cani: aspetti istopatologici ed

ultrastrutturali. Paciello Orlando, Russo Valeria, Maiolino Paola, Martano Manuela, Restucci Brunella, Papparella Serenella, pag. 37-41.

Un caso di sospetta malformazione vertebrale complessa (CVM) in un vitello frisone di 6 mesi. Lepri Elvio, Sforza Monica, Capuccini Silvia, Vitellozzi Giovanni, pag. 42-46.

Osservazioni istochimiche e immunoistochimiche sull'ipofisi anteriore di un cane affetto da Cushing secondario. Stefano Rocca, Salvatore Pirino, Elisabetta Antuofermo, Stefania Idili, Gabriella Casula, Antonio Leoni, pag. 47-50.

L'urolachina IIIB: nuovo marker per i tumori vescicali nei bovini associato all'infezione da papillomavirus bovino tipo-2. Russo Valeria, Ambrosio Vincenzo, Borzacchiello Giuseppe, Galati Pasquale, Roperto Sante, Roperto Franco, pag. 51-54.

Caratteristiche cliniche e patologiche della leucodistrofia a cellule globoidi nel gatto. Salvadori Claudia, Arispici Mario, Cantile Carlo, pag. 55.

La reattività microgliale associata ad inoculazione intracranica di IL12 e IL18 nella patogenesi della scrapie murina. Studio preliminare. Mandara Maria Teresa, Capuccini Silvia, Ricci Giovanni, Agrimi Umberto, Nonno Romolo, Pasquali Paolo, pag. 56.

Reperti anatomo-istopatologici ed immunoistochimici dello schwannoma bovino. Bozzetta Elena, Pezzolato Marzia, Grattarola Carla, Banchi Cristina, pag. 57-60.

Indagini istologiche, immunoisto-chimiche e immunobiochimiche in capre clinicamente sane provenienti da un focolaio di scrapie. Leoni Antonio, Ligios Ciriaco, Rocca Stefano, Madau Laura, Pirino Salvatore, Cancedda Maria Giovanna, Zucca Rosalba, Nieddu Antonio Mario, pag. 61-65.

Studio preliminare sull'espressione

immunoistochimica dell'eritropoietina e del suo recettore nel tumore mammario di cane. Sfacteria Alessandra, Mazzullo Giuseppe, Lanteri Giovanni, De Vico Gionata, Macri Battesimo, pag. 66-68.

Espressione immunoistochimica della cicloossigenasi-2 (COX-2) in tessuti mammari sani, iperplastici e neoplastici di gatta: correlazione con parametri clinico-patologici e prognostici. Millanta Francesca, Calandrella Michela, Lorenzi Davide, Vannozzi Iacopo, Poli Alessandro, pag. 69.

Il "tumour grading" come fattore prognostico nei carcinomi mammari infiltranti della cagna. Silvestri Giada, Millanta Francesca, Citi Simona, Della Santa Daniele, Poli Alessandro, pag. 70.

Pansteatite felina associata a tumore pancreatico. Fabbrini Fabrizio, Anfrey Pascal, Viacava Paolo, Abramo Francesca, pag. 71.

I tumori nei gatti nel ventennio 1984-2003: 1696 casi. Marcato Paolo Stefano, Bacci Barbara, pag. 72-75.

Studio immunoistochimico dell'espressione della glicoproteina P nel mastocitoma cutaneo canino in funzione del grado istologico. Rossetti Enrica, Petterino Claudio, Drigo Michele, Castagnaro Massimo, pag. 76-80.

Un caso di malattia renale policistica felina con interessamento cutaneo. Bongiovanni Laura, Romanucci Mariarita, Boari Andrea, Della Salda Leonardo, pag. 81.

Un caso di istiocitoma fibroso maligno in un cane con sintomi prevalentemente neurologici. Capucchio Maria Teresa, Lotti Donatella, Bacchetti Marco, Catalano Deborah, Valenza Federico, pag. 82.

Un infrequente caso di "spindle cell tumor" a localizzazione splenica primaria in un cane. Rilievi citologici ed istopatologici, osservazioni istochimiche ed immunoistochimiche. Antuofermo Elisabetta, Pirino Salvatore, Rocca

Stefano, Anfossi Antonio, Zucca Rosalba, Nieddu A. Mario, pag. 83-87.

Valutazione immunoistochimica dell'espressione di proteina P53 in carcinomi squamosi del letto ungueale in cani di razza schnauzer gigante. Riccaboni Pietro, pag. 88.

Mesotelioma peritoneale deciduoide in un cane: caratterizzazione istochimica, immunoistochimica ed ultrastrutturale. Morini Maria, Bettini Giuliano, Morandi Federico, Burdisso Roberta, Marcato Paolo Stefano, pag. 89-91.

Classificazione istopatologica di 171 casi di linfoma nel cane e nel gatto secondo la classificazione R.E.A.L. Vezzali Enrico, Parodi Andre' Laurent, Bettini Giuliano, Marcato Paolo Stefano, pag. 92-96.

Linfoma primario congiuntivale della palpebra superiore in un cane. Vascellari Marta, Mutinelli Franco, Multari Domenico, pag. 97.

COMUNICAZIONI SIPTS

Fosfolipidosi in patologia tossicologica. Esempi di fosfolipidosi associata alla somministrazione di un nuovo composto in due specie. Lanzoni Anna, Piaia Alessandro, Cristofori Patrizia, pag. 98.

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM): il metodo elettivo per la diagnosi di fosfolipidosi. Faustinelli Ivo, Paschetto Silvia, Suozzi Anna, Lanzoni Anna, pag. 99.

Valore dell'esame dei leucociti periferici nella fosfolipidosi indotta da farmaci. Suozzi Anna, Lanzoni Anna, Faustinelli Ivo, Paschetto Silvia, Cristofori Patrizia, pag. 100.

Processazione istologica "in toto" di topi neonati. Belluco Sara, Grieco Valeria, Rondena Marco, Scanziani Eugenio, pag. 101-104.

Lesioni del tratto gastroenterico correlate alla procedura di irradiazione in topi I29SVEV. Marchesi Francesco, Monestiroli Silvia, Gobbi Alberto, Capillo Manuela, Minucci Saverio,

Pellicci Pier Giuseppe, Scanziani Eugenio, pag. 105.

Valutazione del potenziale cancerogeno di melphalan in topi p53^{+/-} Argentino Storino A., pag. 106.

Valutazione istopatologica del sistema nervoso centrale in topi SJL/J con EAE (encefalomielite allergica sperimentale) indotta e trattati per tempi prolungati con cortisonici. Pellegrini G., Pacelli V., Andreini I., pag. 107.

Valutazione microscopica del sistema nervoso periferico mediante tecniche di istochimica. Argentino-Storino A., Manno R.A., Pesce D., Perna E., pag. 108.

L'aza-antracenedione pixantrone (BBR 2778) conferma il suo ridotto potenziale cardiotoxic vs. standards di riferimento anche in topi pre-trattati con doxorubicina. Crippa Luca, pag. 109.

Caratterizzazione istologica di un carcinoma ovarico umano transfettato con vascular endothelial growth factor e trapiantato in topi nudi. Riccardi Elena, Belluco Sara, Manenti Luigi, Marchini Sergio, Scanziani Eugenio Giavazzi Raffaella, pag. 110-114.

Patologia spontanea in una colonia di marmoset comuni (Callithrix jacchus). Lanzoni Anna, Piaia Alessandro, Paschetto Silvia, Cristofori Patrizia, pag. 115.

Lesioni spontanee in ratti sprague-dawley utilizzati in studi preliminari di tossicologia. Piaia Alessandro, Lanzoni Anna, Faustinelli Ivo, Cristofori Patrizia, pag. 116.

Modelli animali di tumore. Giusti Anna Maria, Terron Andrea, pag. 117-121.

Sviluppo di una metodica per lo studio dell'espressione genica in tessuti inclusi in paraffina mediante l'uso del laser capture microdissection. Ferrari Rosaria, Frisk Anna-Lena, Barbaria Elena M., Terron Andrea, Mahnke Axel, pag. 122.

Lesioni del midollo osseo conseguenti al trattamento con composti anti tumorali. Terron Andrea, Giusti Anna Maria, **pag. 123.**

Alterazioni endoteliali indotte nella corticale del surrene di ratto. Studio ultrastrutturale. Della Torre Paola, Terron Andrea, Sammarti Umberto, **pag. 124-128.**

Lesioni nucleari in epatociti di primate non umano (Cynomolgus monkey) con diabete spontaneo. Klapwijk C. Jan, Terron Andrea, Steidler Stephanie, **pag. 129-132.**

COMUNICAZIONI DEL GRUPPO DI PATOLOGIA CLINICA VETERINARIA

The value of bone marrow analysis in the differential diagnosis in anaemic animals. Archer Joy, **pag. 133.**

Colorazione di oil-red-O nella diagnostica citologica del liposarcoma del cane. Masserdotti Carlo, **pag. 134.**

Indagini sul ruolo diagnostico e prognostico della misurazione di alcune proteine di fase acuta nel sangue di cani con leucocitosi. Spiranelli Eleonora, Bonfanti Ugo, Ceron José Joaquin, Paltrinieri Saverio, **pag. 135-139.**

Aspetti clinici, citologici e citofluorimetrici di un caso di neoplasia istiocitaria maligna in un Bernese. Bonfanti Ugo, Comazzi Stefano, Gelain Maria Elena, **pag. 140.**

Caratteristiche citopatologiche dell'emangiosarcoma nel cane. Bertazzolo Walter, Dell'orco Marta, Bonfanti Ugo, Massedotti Carlo, Caniatti Mario, Crippa Luca, Roccabianca Paola, **pag. 141.**

Un caso di sindrome uremico-emolitica in un cane. Dell'orco Marta, Bertazzolo Walter, Pagliaro Luigi, Roccabianca Paola, **pag. 142.**

Rilievi clinico-diagnostici in corso di artropatie del cane. Mazzullo Giuseppe, De Vico Gionata, **pag. 143-147.**

Dati preliminari sull'espressione citofluorimetrica degli antigeni comuni CD18 e CD45 nei leucociti ematici del cane in condizioni normali e in corso di neoplasie ematopoietiche. Gelain Maria Elena, Giordano Alessia, Pieralisi Cristina, Comazzi Stefano, **pag. 148-151.**

Esame citologico di un nodulo sottocutaneo in un gatto. Ghisleni Gabriele, Roccabianca Paola, Caniatti Mario, **pag. 152.**

Calcificazione dei cuscinetti plantari in un gatto con insufficienza renale cronica. Carli Andrea, Pisani Guido, Chiodo Lorenza, Gregori Michela, Abramo Francesca, **pag. 153.**

Sindrome epato-cutanea nel cane Albanese Francesco, Cantile Carlo, Abramo Francesca, **pag. 154.**

COMUNICAZIONI DEL GRUPPO VETERINARIO DI ANALISI DI IMMAGINE

Morfometria nucleare nelle epulidi acantomatose e nei carcinomi squamosi della gengiva nel cane. Martano Manuela, Restucci Brunella, Paciello Orlando, Maiolino Paola, **pag. 155-158.**

L'analisi d'immagine nella valutazione del KI-67 nel mastocitoma cutaneo canino per la sottotipizzazione del grado istologico. Petterino Claudio, Castagnaro Massimo, **pag. 159-161.**

Valutazione morfometrica di quadri istopatologici gastrici indotti da trattamento in studi preclinici su ratto. Chiusolo Arianna, Lanzoni Anna, **pag. 162.**

Analisi frattale del tricoblastoma "ribbon type" del cane. De Vico Gionata, Macrì Battesimo, Cataldi Marielda., Maiolino Paola, Beltraminelli Sandro, Losa Gabriele, **pag. 163.**