FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

I MODELLI ANIMALI SPONTANEI PER LO STUDIO DELLA FISIOLOGIA E PATOLOGIA DELL'UOMO

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

1°2

I MODELLI ANIMALI SPONTANEI PER LO STUDIO DELLA FISIOLOGIA E PATOLOGIA DELL'UOMO

Non è la specie più intelligente a
sopravvivere e nemmeno quella più forte.
È quella più predisposta ai cambiamenti

Charles Robert Darwin

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica
40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio
44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti

46 - 2000 Animali, terapia dell'anima

47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000

48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

49 - 2001 Tipizzare le salmonelle

50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria

51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina

52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte

53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento

54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE

55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo

56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina

57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli

59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria

60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito

62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005

63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio

64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium

66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione

67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo

68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting

69 - 2007 Atti del XXX corso in Patologia Suina

70 - 2007 Microbi e alimenti

71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

72 - 2008 Proceedings of the 9th World Rabbit Congress

73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria

74 - 2009 La biosicurezza in veterinaria

75 - 2009 Atlante di patologia suina I

76 - 2009 Escherichia Coli

77 - 2010 Attività di mediazione con l'asino

78 - 2010 Allevamento animale e riflessi ambientali

79 - 2010 Atlante di patologia suina II Prima Parte

80 - 2010 Atlante di patologia suina II Seconda Parte

81 - 2011 Esercitazioni di microbiologia

82 - 2011 Latte di asina

83 - 2011 Animali d'affezione

84 - 2011 La salvaguardia della biodiversità zootecnica

85 - 2011 Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

86 - 2011 Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

87 - 2011 Atlante di patologia suina III

88 - 2012 Atti delle Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011

89 - 2012 Micobatteri atipici

90 - 2012 Esperienze di monitoraggio sanitario della fauna selvatica in Provincia di Brescia

91 - 2012 Atlante di patologia della fauna selvatica italiana

92 - 2013 Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine

93 - 2013 Medicina veterinaria (illustrato). Una lunga storia. Idee, personaggi, eventi

94 - 2014 La medicina veterinaria unitaria (1861-2011)

95 - 2014 Alimenti di origine animale e salute

96 - 2014 I microrganismi, i vegetali e l'uomo

97 - 2015 Alle origini della vita: le alghe

98 - 2015 Regimen Sanitatis Salerni

99 - 2015 Atti del VI Congresso Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

100 - 2015 Equus Frenatus. Morsi dalla Collezione Giannelli

101 - 2016 Lactose and gluten free: alimenti del domani?

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
- BRESCIA, ITALY -

Direttore scientifico: Prof. E. LODETTI

I MODELLI ANIMALI SPONTANEI PER LO STUDIO DELLA FISIOLOGIA E PATOLOGIA DELL'UOMO

Franco Guarda[1], Enrico Bollo[1], Domenico Barone[2],
Raffaella De Maria[1], Giovanni Loris Alborali[3]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino;
[2] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER),
sezione di Brescia

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia

ISBN 978-88-97562-16-0

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, aprile 2017

Litos - Gianico (BS) 2017

INDICE

Premessa XV
Presentazione XIX
Ringraziamenti XXI

CAPITOLO 1. Modelli animali spontanei di fisiologia comparata

***Arbacia punctulata* e altri echinodermi, modelli animali in ricerche su fertilizzazione degli oociti, chemotassi, sviluppo embrionale e partenogenesi sperimentale**
DOMENICO BARONE 5

***Arbacia punctulata* e altri echinodermi, modelli animali in ricerche sull'RNA durante lo sviluppo embrionale, sui toposomi, sulla chemotassi e sul ruolo di resact e speract**
DOMENICO BARONE 15

***Aplysia californica*, modello animale per ricerche di neurobiologia, delle basi molecolari dell'apprendimento e della memoria**
DOMENICO BARONE 29

***Aplysia californica*, modello animale per ricerche sul comportamento di difesa chimica attiva e di contromisure difensive**
DOMENICO BARONE 39

***Octopus vulgaris*, modello animale in ricerche sull'evoluzione comparata dei meccanismi di apprendimento e memoria**
DOMENICO BARONE 43

Il tritone *Pleurodeles waltl*, modello animale in ricerche di biologia e fisiologia dello sviluppo e sulla rigenerazione dei tessuti nello spazio
DOMENICO BARONE 53

Il tritone *Pleurodeles waltl*, modello animale per ricerche su induzione e determinazione neurali, sul ricupero della locomozione bimodale e sulla rigenerazione dei tessuti danneggiati
DOMENICO BARONE 64

***Pleurodeles waltl*, anfibio urodelo, modello animale per ricerche sulla rigenerazione retinica e sui relativi meccanismi di attivazione (1a parte)**
DOMENICO BARONE 69

***Pleurodeles waltl*, anfibio urodelo, modello animale per ricerche su segnali molecolari, espressione genica, risorse interne e tipi cellulari coinvolti nella rigenerazione della retina (2a parte)**
DOMENICO BARONE 80

***Chrysemis picta bellii*, tartaruga modello animale per ricerche sulla salute umana, in studi evoluzionistici, di genetica e biologia evolutiva e di plasticità fenologica**
DOMENICO BARONE, FRANCO GUARDA 90

***Microtus ochrogaster*, roditore, modello animale per lo studio delle basi neurologiche, genetiche, evolutive e molecolari dei comportamenti sociali**
DOMENICO BARONE 97

Acomys cahirinus (*spiny mouse*), **roditore, modello animale per lo studio delle mestruazioni nella donna**
DOMENICO BARONE 102

Cuori di roditori in letargo, modelli per la messa a punto di nuove strategie di cardioprotezione in farmacologia, cardiochirurgia e transplantologia
DOMENICO BARONE 109

***Macropus eugenii*, modello animale di fisiologia del salto, del ricupero energetico elastico, di biologia della riproduzione e dello sviluppo**
DOMENICO BARONE, FRANCO GUARDA 122

***Macropus eugenii*, modello animale per studi di genomica comparata e per lo sviluppo di nuovi antimicrobici**
DOMENICO BARONE, FRANCO GUARDA 128

***Camelus dromedarius*, modello animale per lo studio dell'immunità e di innovative strategie di ricerca, terapeutiche e diagnostiche**
DOMENICO BARONE, FRANCO GUARDA 134

CAPITOLO 2. Modelli animali spontanei di patologia comparata

Capitolo 2.1. Modelli di malattie genetiche, degenerative e metaboliche

Le malattie da accumulo lisosomiale in patologia comparata
MASSIMO CASTAGNARO 147

***Sus scrofa* come modello spontaneo di Gangliosidosi GM2 dell'uomo**
VALERIA BERTANI, ATTILIO CORRADI, GIUSEPPE MERIALDI, FRANCESCA RAVANETTI, ALESSANDRO ZOCCA, FABIO GUBELLINI, ANTONIO CACCHIOLI, ROSANNA DI LECCE, ANNA MARIA CANTONI 155

Malformazioni animali e loro importanza in patologia comparata
GIUSEPPE MAZZULLO, BATTESIMO MACRÌ 168

L'ipertermia maligna nell'uomo e nel suino
ELENA CANELLI, PAOLO BORGHETTI, PAOLO MARTELLI 180

Il Suino nero siciliano quale modello comparativo per lo studio della pseudomelanosi acquisita nell'uomo
GIOVANNI LANTERI, FABIO MARINO 188

Modelli animali per lo studio della neurodegenerazione e della neuropatologia dell'invecchiamento
MARIA TERESA CAPUCCHIO, ILARIA BIASATO, ELENA BIASIBETTI 194

Modelli animali canini per lo studio delle degenerazioni retiniche umane
DANIELA GIRETTO 207

***Chinchilla lanigera* modello animale per lo studio della presbiacusia, delle patologie e dei traumi della membrana timpanica**
DOMENICO BARONE, FRANCO GUARDA 225

***Octopus vulgaris* e *Nothobranchius furzeri*, modelli animali di neurogenesi adulta e di modulazione della gliosi nell'invecchiamento, e *Sepia officinalis*, modello di maturazione gangliare asincrona e ritardata durante la neurogenesi embrionale**
Domenico Barone 232

L'African turquoise killifish, *Nothobranchius furzeri* (Jubb, 1971), come modello ottimale per lo studio dei processi di invecchiamento nell'uomo
Cristian Salogni 240

Da un piccolo pesce africano, un grande modello per lo studio dell'invecchiamento e delle patologie degenerative
Giacomo Rossi 248

Il cane quale modello spontaneo per lo studio delle malformazioni cardiache ereditarie dell'uomo
Franco Guarda, Ilaria Biasato, Domenico Barone 263

Il colombo White Carneau e il suino: modelli spontanei per lo studio dell'aterosclerosi umana
Franco Guarda, Domenico Barone, Pietrangelo Perrone 269

L'arteriosclerosi coronarica del salmone come modello di studio delle coronaropatie dell'uomo
Marco Galeotti 273

Le escrescenze di lambl del cavallo: modello di studio delle stesse lesioni nell'uomo
Franco Guarda, Bartolomeo Biolatti, Frine Eleonora Scaglione, Enrico Bollo 283

L'endocardiosi: stato dell'arte nei riflessi della patologia comparata e della filogenesi
Franco Guarda, Battesimo Macrì, Loris Gay, Frine Eleonora Scaglione 288

La cardiomiopatia ipertrofica felina: un valido modello animale spontaneo per lo studio della malattia nell'uomo
Ilaria Biasato 302

I modelli animali per la distrofia di Duchenne
Elena Biasibetti, Ilaria Biasato, Maria Teresa Capucchio 310

La mielopatia degenerativa del cane quale modello spontaneo della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) dell'uomo
Maria Teresa Capucchio, Elena Basibetti, Ilaria Biasato, Maria Teresa Giordana 318

La sindrome di Ellis-Van Creveld nel bovino. Condivisione uomo-bovino di un tipo di condrodisplasia su base genetica
Luisa Vera Muscatello, Giancarlo Avallone, Keren Elizabeth Dittmer, Keith Gordon Thompson, Giuseppe Sarli, Barbara Brunetti, Leonardo Murgiano, Arcangelo Gentile, Germana Beha, Michela Levi, Valeria Pellegrino, Cinzia Benazzi 327

Il ruolo del cane come modello animale nella Malattia Renale Cronica dell'uomo
Luca Aresu 333

Il lattonzolo e il vitello da latte: modelli spontanei per lo studio dei cosiddetti "infarti urici renali" del bambino lattante
Silvia Mioletti, Stefano Amedeo, Franco Guarda 338

Capitolo 2.2. Modelli di malattie infettive

Modelli animali delle malattie da prioni: importanza in patologia comparata
Maria Teresa Capucchio, Ilaria Biasato, Elena Biasibetti 345

Retrovirosi degli animali e dell'uomo: aspetti di patologia comparata
Enrico Bollo, Frine Eleonora Scaglione 353

L'infezione da Morbillivirus nei Cetacei: un interessante modello di studio e di neuropatologia comparata
Giovanni Di Guardo, Sandro Mazzariol, Walter Mignone, Franco Guarda 361

La malattia aleutina del Visone: modello spontaneo per lo studio delle arteriti da immunocomplessi nell'uomo
Franco Guarda 372

***Marmota monax* (Woodchuck), modello animale per ricerche sulla patogenesi, sull'evoluzione e sulle terapie dell'epatite B**
Domenico Barone, Franco Guarda 375

***Saguinus oedipus*, primate modello animale per lo studio dell'infezione da virus di Epstein-Barr**
Domenico Barone, Franco Guarda 388

Affinità patologiche nelle infezioni clamidiali dell'ovidutto nel bovino e nell'uomo come modello naturale per lo studio dell'infertilità
Simonetta Appino, Paola Pregel, Ada Rota 394

L'opossum in cattività, modello spontaneo per lo studio dell'endocardite batterica nell'uomo
Franco Guarda 399

Il suino come modello di studio della tubercolosi ossea nell'uomo (morbo di Pott)
Benedetta Amato, Maria Vitale, Maria Teresa Capucchio, Michele Fiasconaro, Roberto Puleio, Vincenzo Di Marco Lo Presti 403

Infezioni spontanee e patologie da *Helicobacter* spp. negli animali: quali insegnamenti per l'uomo?
Lucia Minoli, Marzia Ferrario, Lucile Lhoste, Alessandro Rigamonti, Pierpaolo Romanelli, Andrea Cappelleri, Marcella De Maglie, Camilla Recordati, Eugenio Scanziani 411

Confronto tra Paratubercolosi dei ruminanti (malattia di Johne) e Morbo di Crohn dell'uomo
Michele Fiasconaro, Benedetta Amato, Maria Vitale, Vincenzo Di Marco Lo Presti 423

La malaria: dalle prime scoperte nei volatili allo studio della malattia nell'uomo
Frine Eleonora Scaglione, Enrico Bollo, Bartolomeo Biolatti, Paola Pregel, Francesca Tiziana Cannizzo 438

Modelli animali nel cane e in primati non umani per lo studio della patofisiologia della cardiomiopatia chagasica umana e di terapie innovative
Domenico Barone, Franco Guarda 447

Roditori, pulcini e conigli, modelli animali per lo studio del morbo di Chagas dell'uomo
Domenico Barone, Franco Guarda 459

La raccolta di dati sugli animali, nella sorveglianza e la valutazione del rischio delle zoonosi nell'uomo
Alessandro Mannelli 471

Capitolo 2.3. Modelli di malattie neoplastiche

I tumori spontanei negli animali come modelli di studio per l'oncologia comparata
Paolo Cascio e Raffaella De Maria 476

L'osteosarcoma del cane come modello di studio in oncologia comparata
Mariarita Romanucci, Laura Bongiovanni, Marcella Massimini 481

Patologie pre-neoplastiche e neoplastiche della prostata canina: valido modello per il carcinoma prostatico ormono–resistente dell'uomo
Leonardo Della Salda, Vittoria Di Domenico 490

Le neoplasie mammarie dei carnivori domestici: analogie con il modello umano
Alessandro Poli, Francesca Millanta, Valentina Zappulli, Raffaella De Maria, Michela Levi, Giuseppe Sarli 499

Il melanoma maligno canino in oncologia comparata
Chiara Brachelente, Monica Sforna, Ilaria Porcellato, Laura Bongiovanni, Raffaella De Maria, Luca Mechelli 512

Il ruolo dei papillomavirus bovini in oncologia comparata
Sante Roperto, Franco Roperto 523

Carcinoma a cellule squamose del gatto: modello di cancerogenesi spontanea per il carcinoma testa-collo dell'uomo
Giuseppe Borzacchiello, Gennaro Altamura 530

Il seminoma del cane come modello di studio dei seminomi umani
Valeria Grieco, Barbara Banco 536

Il suino giovane quale modello spontaneo per lo studio del tumore di Wilms nel bambino
Franco Guarda, Domenico Barone 546

Il cane come modello animale per lo studio delle neoplasie ematopoietiche dell'uomo
Stefano Comazzi, Luca Aresu 551

Vaccinoterapia a DNA nel melanoma maligno canino come studio pre-clinico del melanoma umano
Valeria Rolih, Federica Cavallo, Paolo Buracco, Federica Riccardo 558

Le terapie a bersaglio molecolare in oncologia comparata: il mastocitoma canino come modello per l'utilizzo di inibitori specifici per il recettore c-kit
Nicola Zizzo, Monica Fiorentini, Girolamo Ranieri, Rosa Patruno 567

I teleostei quali modello di studio in oncologia comparata
Fabio Marino, Giovanni Lanteri, Battesimo Macrì 579

I tumori dei nervi periferici dei pesci quali modello di studio in oncologia comparata
Fabio Marino, Giovanni Lanteri, Battesimo Macrì 583

Molluschi bivalvi: modelli emergenti in oncologia comparata
Gionata De Vico, Francesca Carella 594

Capitolo 2.4. Modelli di altre malattie

Gli animali da reddito come modelli per patologie umane: approccio proteomico
Cristina Lecchi, Fabrizio Ceciliani 607

***Chinchilla lanigera*, modello animale per ricerche sulla fisiopatologia, terapia e prevenzione dei danni indotti, sulla funzione uditiva, dall'esposizione ai rumori**
Domenico Barone, Franco Guarda 616

***Arbacia punctulata, Paracentrotus lividus* e altri ricci marini, modelli animali in farmaco-tossicologia, teratogenesi ed eco-tossicologia marina**
Domenico Barone 626

***Arbacia punctulata, Paracentrotus lividus* e altri ricci marini, modelli animali in ricerche di eco-tossicologia marina su metalli, metalloidi e interferenti endocrini**
Domenico Barone 636

Cisti trichilemmali e ipotricosi nel suino sono simili a quelle dell'uomo
Franco Guarda, Enrico Bollo, Giovanni Loris Alborali, Stefano Giovannini, Matteo Gradassi, Michele Apicella, Maria Teresa Capucchio 648

Capitolo 3. Nuove frontiere della ricerca sui modelli animali in fisiologia e patologia comparata

Quale naso per la sicurezza alimentare? *You can teach a dog new tricks*
Federica Cheli, Vittorio Dell'Orto 657

The research venture in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a paradigm of translational medicine
Gaetano Thiene 664

***Xenopus laevis*, anfibio anuro, modello animale di rigenerazione degli arti amputati, colma il gap conoscitivo tra gli anfibi Urodeli rigeneranti e i vertebrati superiori non rigeneranti**
Domenico Barone 676

PREMESSA

Da quando *Homo sapiens* è apparso sulla Terra, i suoi rapporti con gli animali hanno subito molteplici sviluppi, influenzati da motivi mitici, religiosi, evoluzionistici, antropologici, sino ad arrivare all'attuale riconoscimento di animali senzienti e, per questo, più vicini all'uomo, come espressione di una parentela sempre più stretta.

Nella cultura egizia, gli animali sono deizzati con immagini metà uomo, metà animali, così come nella mitologia greca. È sufficiente ricordare nell'antico Egitto la Sfinge e la dea Anubi, e, nella cultura greca, il Minotauro e il centauro Chirone, considerato il precursore della Veterinaria e maestro di Esculapio.

Con la rivoluzione neolitica e la trasformazione dell'uomo da raccoglitore e cacciatore ad agricoltore e allevatore, nonché con la domesticazione di alcune specie di animali, cambiò la mentalità dell'uomo, con l'utilizzo dell'animale al suo servizio, rompendo in parte l'armonia esistente tra l'uomo e la natura.

Dal mito quindi nacque la religione e poi la medicina, il tutto dominato dalla forza sovrannaturale che permea l'esistenza. Nelle civiltà primitive infatti si confusero per molto tempo la medicina dell'uomo e degli animali, che si separarono con la filosofia di Socrate e Platone. Per gli Egizi, Medici e Veterinari erano considerati sacerdoti, così come nell'antica Cina i sacerdoti dei cavalli potevano curare gli animali.

Dal momento che, per motivi religiosi, non era possibile eseguire dissezioni sull'uomo, i Medici le eseguivano sugli animali, al fine di ottenere nozioni utili da applicare agli uomini. Nascono così la medicina e la patologia comparata; questa branca della medicina ha perciò origini antiche. Essa nasce quando la medicina teurgica diventa scienza razionale, dal V secolo a.C., a Crotone, come afferma Luciano Sterpellone, con il primo tentativo di chiarire le leggi che governano la vita.

Alcmeone di Crotone (490-430 a.C.) fu certamente tra i primi a eseguire dissezioni anatomiche sugli animali e, forse, anche sull'uomo, ponendo le basi della medicina scientifica.

Con Ippocrate (460-377 a.C.), la medicina diventa veramente razionale, e tutto ciò che si conosceva era in gran parte la trasposizione all'uomo delle osservazioni tratte dagli animali.

Galeno di Pergamo (129-199 d.C.), sezionando un suino, dimostrò che, se si recideva il nervo laringeo ricorrente, l'animale non era più in grado di emettere grida acute. Lo stesso Galeno si era specializzato nella dissezione di suini e scimmie, osservando per primo lesioni dei vasi cerebrali negli animali. È importante ricordare che questo grande medico basò la propria dottrina esclusivamente sugli esperimenti, valorizzando i criteri essenziali delle scienze mediche, cioè l'osservazione e l'esperimento.

Durante la Scuola Salernitana, Cofone (XI-XII sec.) fu famoso per il volume su *Anatomia porci*. Andrea Cesalpino (1519-1603) con le autopsie dimostrò sperimentalmente che il cuore è il centro della circolazione del sangue nell'organismo.

Fabrizio d'Acquapendente (1533-1619), professore a Padova, affermò la necessità di approfondire l'anatomia comparata, l'embriologia comparata e l'embriologia animale per meglio capire struttura e funzioni degli organi animali.

Queste scoperte hanno preparato la strada alla grande scoperta di William Harvey (1578-1657) sulla circolazione sanguigna, svolgendo esperimenti su oltre 40 specie animali.

Marcello Malpighi (1628-1694), dopo un secolo, scoprì i capillari nel polmone e nel mesentere di rana, completando così il capitolo sulla circolazione sanguigna.

Giovan Battista Morgagni (1682-1771) codificò l'anatomia patologica come materia integrante della clinica, nuova evoluzione dell'attività medica. Studiò, nella pecora, la cirrosi epatica, causa diretta dell'ascite.

Edward Jenner (1749-1823) ideò il vaccino contro il vaiolo, utilizzando le croste vaiolose di bovini infetti e debellando così questa orribile malattia.

Paul Ehrlich (1854-1915), con le sue scoperte sul sangue della pecora, scoprì gli antigeni e gli anticorpi di gruppo.

Ivan Pavlov (1849-1936) scoprì i riflessi condizionati, così importanti nell'uomo, studiandoli nel cane.

Si potrebbe continuare con una lunga serie di Premi Nobel vinti con ricerche eseguite sugli animali, portando notevoli contributi alla comprensione delle patologie umane. È sufficiente ricordare Alexis Carrel (1873-1944) per i trapianti di organi, Ronald Ross (1857-1932) per la malaria, Robert Koch (1876-1910) per la tubercolosi e altre malattie degli animali, Frederck Grant Banting (1891-1941) per la scoperta dell'insulina, Gerhard Domagk (1895-1964) per i sulfamidici, Alexander Fleming (1881-1955) per la penicillina, Selman Waksman (1888-1973) per la streptomicina da una muffa isolata da un'anitra, Francis Peyton Rous (1879-1970) per i virus oncogeni, Konrad Lorenz (1903-1989) per l'etologia, Daniel Carleton Gaidusek (1923-2008) per le encefalopatie trasmissibili, e molti altri ancora che, grazie alle scoperte sugli animali, portarono notevoli contributi alla conoscenza e alla cura delle patologie umane.

Il problema, ancora oggi in parte irrisolto, è la ricerca del modello animale di patologia ideale per lo studio e la risoluzione della relativa patologia umana, anche se forse è un sogno, per ora difficile da realizzare, trovare un modello per ogni tipo di malattia. Questo scoglio potrà essere superato in futuro col ricorso alle nuove tecnologie di biologia molecolare e del DNA ricombinante, per produrre animali geneticamente modificati più simili all'uomo.

Questo volume costituisce un tentativo di riunire alcuni modelli animali, dai più semplici ai più evoluti, quali esempi di meccanismi fisiologici e di patologie analoghe a quelle umane, dalle malattie genetiche a quelle metaboliche, neoplastiche, infettive, parassitarie, immunitarie in modo da offrire ai ricercatori esempi per lo studio delle corrispondenti patologie umane.

L'uso degli animali per studi sulle malattie umane ha contribuito in modo determinante alla loro conoscenza, dalla diagnosi clinica alla patogenesi, dalla patologia alla prevenzione alla terapia.

Dobbiamo tuttavia riconoscere che i modelli animali presentano alcune limitazioni, insite nelle differenze di specie, di anatomia, di fisiologia e di metabolismo. D'altra parte, ci sono molteplici vantaggi per lo studio di malattie simili negli animali e nell'uomo; gli animali possono essere allevati, incrociati tra parenti e studiati per brevi o lunghi periodi, prima della morte naturale. Inoltre il vecchio principio che limitava lo studio essenzialmente ai roditori è stato da tempo superato. Infatti, buona parte dei vertebrati, dai pesci agli uccelli ai mammiferi come bovini, suini, pecore, capre e altri ancora, possono rappresentare buoni modelli spontanei di malattie umane. Dobbiamo ammettere, d'altro canto, che non esiste un modello animale perfetto.

In questi ultimi decenni, sono stati pubblicati numerosi lavori su ricerche che usavano modelli animali modificati geneticamente, inserendo o silenziando uno o più geni per renderli più simili all'uomo. La bibliografia su questi temi è immensa ed esula dal nostro modesto programma. Infatti, in questo volume desideriamo portare la nostra attenzione sugli animali che presentano patologie spontanee sovrapponibili o simili a quelle umane quali esempi di modelli naturali di malattie o di patologie di organi umani. In questo

senso, il panorama animale è vasto, coinvolgendo pressappoco tutti i vertebrati, da quelli più lontani a quelli filogeneticamente più vicini all'uomo. Purtroppo, per un insieme di difficoltà, non potremo svolgere tutta la materia come vorremmo, ma cercheremo di dare un contributo italiano a questa importante branca delle scienze biomediche.

Ciononostante siamo orgogliosi del lavoro svolto, anche se siamo convinti che un lavoro fatto bene possa essere fatto meglio.

Gli Editors:
Franco Guarda
Enrico Bollo
Domenico Barone
Raffaella De Maria
Giovanni Loris Alborali

PRESENTAZIONE

La Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia è particolarmente lieta di arricchire la sua collana editoriale con una pubblicazione di prestigio che ha come argomento "I modelli animali spontanei per lo studio della fisiologia e patologia dell'uomo".

La Fondazione ringrazia gli Editors Franco Guarda, Enrico Bollo, Domenico Barone, Raffaella De Maria, docenti e ricercatori del Dipartimento di Scienze Veterinarie e del Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi dell'Università degli Studi di Torino nonché Giovanni Loris Alborali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna di Brescia.

L'immenso lavoro svolto permette di mettere a disposizione dei cultori della materia la storia, gli aggiornamenti e le possibilità di applicazione di questa importante branca della medicina su:

- Modelli Animali spontanei di fisiologia comparata.
- Modelli animali spontanei di patologia comparata.
- Nuove frontiere della ricerca sui modelli animali in fisiologia e patologia comparata.

Infine un particolare ringraziamento al professor Bartolomeo Biolatti Direttore del Cento Europeo di Referenza sulle Malattie Comparate dell'Uomo e degli Animali " Bruno Maria Zaini " dell'Università degli Studi di Torino.

Fondazione Iniziative
Zooprofilattiche e Zootecniche
BRESCIA

Il Segretario Generale
Dr. Stefano Capretti

RINGRAZIAMENTI

Gli Editors di questo volume e gli Autori dei lavori desiderano esprimere alla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, e in particolare al Presidente, al Segretario Generale dott. S. Capretti e al Direttore Scientifico dr. E. Lodetti, i più vivi ringraziamenti per l'incoraggiamento ricevuto, per la loro squisita sensibilità e disponibilità, nonché per la fiducia e la lungimiranza riposte nell'ideazione e realizzazione di questa nostra opera, che può aprire nuove strade negli studi di medicina comparata.

Si ringrazia inoltre la Tipografia per l'eccellente veste tipografica del volume.

Si ringrazia anche la casa editrice Point Vétérinaire Italie per aver concesso la riproduzione degli articoli pubblicati su "Summa - Animali da Compagnia" e su "Summa - Animali da Reddito" all'interno della presente rassegna.

Infine un ringraziamento particolare alla memoria del dott. Corrado Zaini che, attraverso la Fondazione Bruno Maria Zaini, ha finanziato per oltre 20 anni il "Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini" del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino, permettendo di continuare gli studi sulla patologia comparata, in parte oggetto di questo volume.

ELENCO DEGLI AUTORI IN ORDINE ALFABETICO

- Alborali G.L.
- Altamura G.
- Amato B.
- Amedeo S.
- Apicella M.
- Appino S.
- Aresu L.
- Avallone G.
- Banco B.
- Barone D.
- Behag G.
- Benazzi C.
- Bertagni V.
- Biasato I.
- Biasibetti E.
- Biolatti B.
- Bollo E.
- Bongiovanni L.
- Borghetti P.
- Borzacchiello G.
- Brachelente C.
- Brunetti B.
- Buracco P.
- Cacchioli A.
- Canelli E.
- Cannizzo F.T.
- Cantoni A.M.
- Cappelleri A.
- Capucchio M.T.
- Carella F.
- Cascio P.
- Castagnaro M.
- Cavallo F.
- Ceciliani F.
- Cheli F.
- Comazzi S.
- Corradi A.
- De Maglie M.
- De Maria R.
- De Vico G.
- Dell'Orto V.
- Della Salda L.
- Di Domenico V.
- Di Guardo G.
- Di Lecce R.
- Di Marco Lopresti V.
- Dittmer K.E.
- Ferrario M.
- Fiasconaro M.
- Fiorentini M.
- Galeotti M.
- Gay L.
- Gentile A.
- Giordana M.T.
- Giovannini S.
- Giretto D.
- Gubellini F.
- Gradassi M.
- Grieco V.
- Guarda F.
- Lanteri G.
- Lecchi C.
- Levi M.
- Lhoste L.
- Macrì B.
- Mannelli A.
- Marino F.
- Martelli P.
- Massimini M.
- Mazzariol S.
- Mazzullo G.
- Mechelli L.
- Merialdi G.
- Mignone W.
- Millanta F.
- Minoli L.
- Mioletti S.
- Murgiano L.
- Muscatello L.V.
- Patruno R.
- Pellegrino V.
- Perrone P.
- Poli A.
- Porcellato I.
- Pregel P.
- Puleio R.
- Ranieri G.
- Ravanetti F.
- Recordati C.
- Riccardo F.
- Rigamonti A.
- Rolih V.
- Romanelli P.
- Romanucci M.
- Roperto F.
- Roperto S.
- Rossi G.
- Rota A.
- Salogni C.
- Sarli G.
- Scaglione F.E.
- Scanziani E.
- Sforna M.
- Thiene G.
- Thomson K.G.
- Vitale M.
- Zappulli V.
- Zizzo N.
- Zocca A.

CAPITOLO 1

MODELLI ANIMALI SPONTANEI DI FISIOLOGIA COMPARATA

PREMESSA

Scopo dei modelli animali raccolti in questa sezione è descrivere, analizzare e comparare quali-quantitativamente le funzioni che caratterizzano le specie scelte quali modelli di funzioni fisiologiche che hanno in comune con l'uomo.

Negli ultimi anni, le ricerche nel campo della fisiologia animale hanno subìto un'accelerazione senza precedenti, evolvendosi e arricchendosi grazie a sofisticate tecniche biochimiche, farmacologiche, di biologia molecolare, di genomica e proteomica, che hanno permesso di individuare molecole, enzimi, recettori, geni e proteine responsabili di determinate funzioni fisiologiche che queste specie condividono con la specie umana, conservate nonostante la grande distanza filogenetica che dall'*Homo sapiens* le divide.

ARBACIA PUNCTULATA E ALTRI ECHINODERMI, MODELLI ANIMALI IN RICERCHE SU FERTILIZZAZIONE DEGLI OOCITI, CHEMOTASSI, SVILUPPO EMBRIONALE E PARTENOGENESI SPERIMENTALE

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Tassonomia, areale geografico e biologia di *Arbacia punctulata*

L'habitat naturale di *Arbacia punctulata* (Jean-Baptiste de Lamarck, 1816), riccio di mare dagli aculei color porpora (purple-spined sea urcin o porcospino marino, Genere *Arbacia*, Famiglia *Arbacidae*, Classe *Echinoidea*, Phylum *Echinodermata*, fig. 1) sono i fondali rocciosi o sabbiosi o conchigliferi dell'Atlantico occidentale, lungo le coste che, dal Massachusetts a Cuba, arrivano fino alla penisola dello Yucatan; dal Texas alla Florida nel Golfo del Messico, da Panama alla Guyana francese alle Piccole Antille. Il termine echinodermi, che deriva dalle parole greche έχινος (échinos, riccio) e δέρμα (derma, pelle), evidenzia come, spesso, l'epidermide di questi animali marini sia ricoperta da varie formazioni, quali aculei e altre protuberanze. Gli animali appartenenti a questo phylum sono detti deuterostomi perché, durante lo sviluppo, il blastoporo della gastrula diviene l'ano, o corrisponde alla regione anale dell'adulto. *Arbacia punctulata* è di forma sub-sferica (diametro 6-8 cm), ispida, con lunghe spine sottili color porpora scura, più corte nella parte inferiore, che è leggermente appiattita, dove circondano l'apparato orale (fig. 2). Il guscio, o dermascheletro (fig. 3), può raggiungere i 3-5 cm di diametro e ha fori attraverso i quali i piedi tubulari (aculei) del riccio si articolano e si estendono, permettendogli di muoversi sul fondo marino. È un riccio essenzialmente erbivoro: si nutre di alghe e di altri organismi che gli crescono attorno, usando una struttura specializzata chiamata "lanterna di Aristotele" (fig. 4), composta da 5 piastre dure, ognuna con un dente all'apice inferiore, che si muovono insieme come un becco, per raschiare il cibo dalle rocce del fondo marino (Harrington, 2014). Gli individui di questa specie, e dei ricci di mare in genere, non presentano dimorfismo sessuale.

Fig. 1. *Arbacia punctulata* (da: Wikipedia)

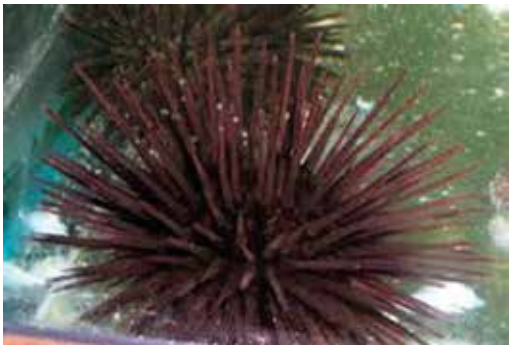


Fig. 2. *Arbacia punctulata:* si noti la parte ventrale appiattita (da: Touchthesea.org)

Fig. 3. Dermascheletro di *Arbacia punctulata*: si noti l'appiattimento della faccia ventrale, al cui centro c'è l'apparato orale con la "lanterna di Aristotele" (da: koghisberg.com)

Fig. 4. "Lanterna di Aristotele" di *Arbacia punctulata*

Arbacia punctulata, modello animale nella ricerca biomedica ed eco-tossicologica

Da più di un secolo, biologi studiosi dello sviluppo considerano il riccio di mare come organismo modello di riferimento per esperimenti di biologia cellulare, di biologia molecolare e dello sviluppo. I vantaggi che questo modello animale offre agli sperimentatori sono molteplici: la possibilità di ottenere animali fertili per la maggior parte dell'anno e di "stabularli" in condizioni controllate, la facilità di indurre il rilascio dei gameti maschili e femminili, la possibilità di indurre e monitorare la fecondazione, i quantitativi consistenti di embrioni sincroni che possono essere coltivati in laboratorio, la rapidità dello sviluppo embrionale e la possibilità di suddividerlo in differenti stadi (fig. 1). Infine, i ricercatori possono contare su una vastissima bibliografia, che copre più di un secolo di ricerche compiute su questi Echinodermi marini, e documenta moltissimi parametri biochimici e di biologia molecolare. Le uova di *Arbacia punctulata* sono trasparenti, possono essere facilmente manipolate in laboratorio e, una volta fertilizzate, lo sviluppo è rapido e sincrono (Rulon, 1947; Kanungo, 2002).

Per oltre un secolo, questo echinoderma è stato usato per giungere alla formulazione della teoria cromosomica dell'ereditarietà, alla descrizione dei centrosomi, della partenogenesi e della fertilizzazione (Failla, 1965; Sachs, 1970; Kite, 1912). Negli ultimi decenni, in questo riccio di mare sono stati dimostrati importanti fenomeni come la stabilità dell'mRNA e il controllo traslazionale, sono stati effettuati l'isolamento e la caratterizzazione dell'apparato mitotico (Zimmerman, 1964), si è scoperto che le sue principali proteine strutturali sono nei microtubuli ed è stata ottenuta la prima evidenza della presenza di actina (proteina globulare) nel citoscheletro di cellule non muscolari (Henson, 1983; Kabatt-Zinn, 1981). Le ricerche su questo echinoderma sono state determinanti per la comprensione delle risposte cellulo-mediate del sistema immunitario (*National Research Council* (NRC), USA, 1999), così come gli embrioni di questa, e di altre specie di ricci marini, sono stati fondamentali per chiarire i processi della fertilizzazione, della divisione cellulare, della regolazione del ciclo cellulare e dello sviluppo embrionale (NRC, 1999; Kominami, 2008). Ad esempio, le cicline, proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, sono state individuate per la prima volta in questo riccio di mare (NRC). I meccanismi della gastrulazione e della formazione dei 3 strati germinali sono stati schematizzati in base a osservazioni fatte sullo sviluppo di embrioni

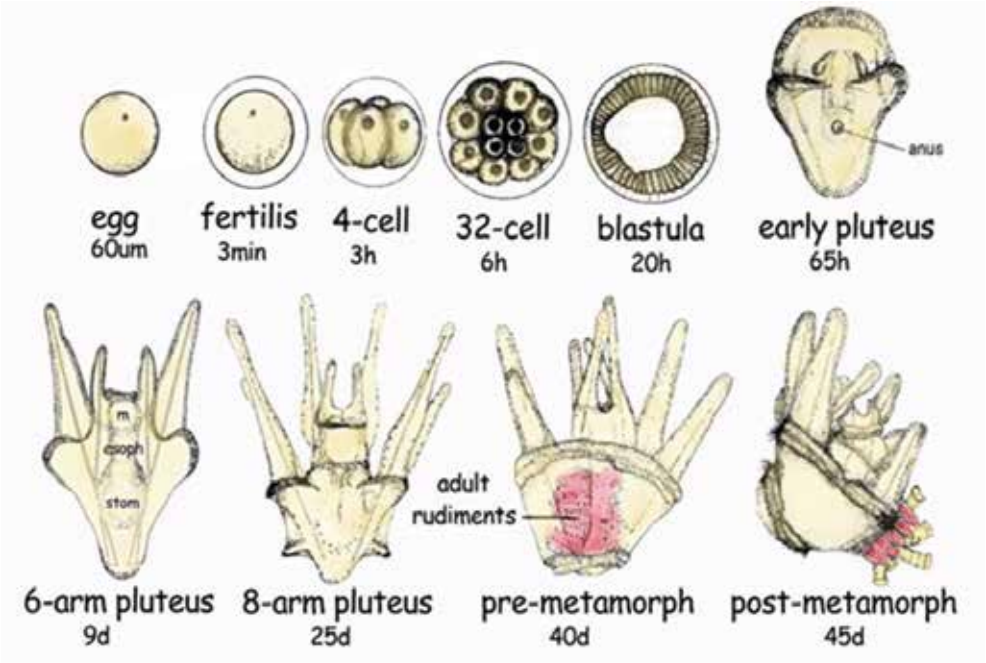


Fig. 5. Fasi dello sviluppo embrionale di riccio di mare: dall'oocita non fecondato allo stadio di post-metamorfosi

di *Arbacia punctulata* e di altri echinodermi (Kominami, 2008). I segnali intracellulari sono un'altra area di ricerca che deve molto a questo riccio marino (NRC). *Arbacia punctulata* è anche modello animale nello studio della tossicità dei sedimenti marini e delle acque costiere (Jäntschi, 2008; Rudolph, 2008) e in ricerche sugli spermatozoi (Lillie, 1915; Inamdar, 2007). Durante la riproduzione, le femmine rilasciano milioni di grandi uova trasparenti, prive di guscio e di membrane protettive. La fertilizzazione è esterna e i grandi zigoti si dividono rapidamente e in modo sincrono; dimensioni e numerosità ne permettono osservazione, manipolazione e campionamento e indirizzano la scelta di fare ricerca usando, come test system, oociti, spermatozoi ed embrioni in vari stadi di sviluppo di *Arbacia punctulata* e di altri ricci di mare (Harrington, 2014). Gli oociti degli echinodermi hanno attratto l'interesse di molti biologi che, usando queste uova come sistema biologico di valutazione, hanno allestito modelli animali per lo studio di una quantità di attività fisiologiche applicate a settori diversi della biologia. Il valore eccezionale degli oociti attraverso l'intero phylum degli Echinodermi è universalmente riconosciuto, ma è convinzione comune che le uova di *Arbacia*, in special modo, posseggano caratteristiche particolarmente adatte per fornire risposte a domande specifiche. In più di un secolo, la ricerca sulle uova di riccio di mare ha coinvolto tutti gli approcci sperimentali, dalla citologia all'embriologia, dalla fisiologia alla biochimica e, in anni più recenti, anche la biologia molecolare, e ha contribuito alla soluzione di molti problemi fondamentali.

Ethel B. Harvey, per prima, studiò i granuli corticali delle uova di *Arbacia* (1911) ed Esther C. Hendee ne descrisse preparazioni citologiche (1931): da allora, questi granuli, definiti corticali per la posizione che occupano negli oociti, sono diventati oggetto d'interesse e di accese controversie tra citologi, embriologi e fisiologi. Sebbene le funzioni negli oociti di alcuni orga-

nismi siano tuttora non del tutto chiarite, c'è un generale consenso sul fatto che i granuli corticali degli oociti di una varietà di organismi siano coinvolti nella fase iniziale del fenomeno multistep della fertilizzazione. Scopo di quest'articolo è illustrare alcuni dei tanti modelli animali basati su *Arbacia punctulata*, usati in varie tipologie di ricerca quali, ad esempio, quelle sulla polispermia sperimentale, sui recettori degli spermatozoi presenti sull'oocita e sulla cosiddetta membrana di fertilizzazione, sul ruolo della perossidosi e sulla partenogenesi sperimentale.

Polispermia sperimentale dell'oocita di *Arbacia punctulata*

Durante il differenziamento degli oociti, i complessi di Golgi, coinvolti nella produzione dei granuli corticali, sono composti da numerosi sacculi accompagnati da vescicole e l'oolemma[1] diventa specializzato, formando brevi e non numerosi, microvilli. Ogni elemento del complesso di Golgi contiene materiale omogeneo piuttosto denso. Si pensa che la componente vescicolare dei complessi di Golgi derivi dalla componente sacculare per un processo di schiacciamento; le vescicole svuotate sono viste come "containers" del/i precursore/i dei granuli corticali. Nel tempo, i granuli coalescono e formano un granulo corticale maturo, il cui contenuto è delimitato da una membrana unitaria. L'apparato di Golgi, quindi, è direttamente coinvolto sia nella sintesi che nella concentrazione dei precursori usati nella produzione dei granuli corticali. Immediatamente dopo l'attivazione dell'oocita da parte dello spermatozoo, l'involucro primario inizia a staccarsi dall'oolemma, formando l'*activation calix*[2]. Dopo la formazione di queste strutture, il contenuto dei granuli corticali e degli *activation calix* sono rilasciati (reazione corticale) nello spazio peri-vitellino. Il rilascio dei costituenti dei granuli corticali si realizza con la fusione, in molti punti, della membrana che li avvolge, con l'oolemma (Anderson, 1968). Il numero di spermatozoi entrati negli oociti resi polispermici con l'esposizione a varie concentrazioni di nicotina (0,025÷0,25%, v:v), è direttamente proporzionale alle concentrazioni testate di questo alcaloide. La risposta corticale è morfologicamente equivalente a quella osservata nelle preparazioni di controllo. Subito dopo essere entrati nell'uovo, tutti gli spermatozoi vanno incontro agli eventi strutturali che sono normalmente associati allo sviluppo del pronucleo maschile negli oociti monospermici. Durante la riorganizzazione degli spermatozoi, si formano gli *sperm-asters*[3]. Generalmente, da 1 a 3 pro-nuclei maschili migrano verso/incontrano il pronucleo femminile. Quando un pronucleo maschile giunge in prossimità del pronucleo femminile, la superficie di quest'ultimo, rivolta verso lo spermatozoo in avvicinamento più prossimo, si appiattisce e diventa molto convoluta. Poi, il pronucleo femminile e quello maschile entrano in contatto tra loro e la membrana interna ed esterna dei due rivestimenti pro-nucleari si fondono, originando il nucleo dello zigote. I pronuclei maschili, che si trovano nello zigote dopo la fusione del pronucleo femminile con un pronucleo maschile, continuano a differenziarsi e si allargano, formano corpi nucleolo-simili e vanno incontro a ulteriore dispersione della cromatina. Nel 90% circa degli zigoti, tutti i rimanenti pronuclei maschili migrano progressivamente verso il nucleo dello zigote e si fondono, formando un grande nucleo, entro 80 minuti circa dall'inseminazione. Mitosi e divisione dello zigote polispermico si verificano tardivamente, rispetto a quanto avviene nelle uova monospermiche (Longo, 1970).

Recettori per gli spermatozoi sugli oociti

È stata fatta una ricerca per appurare se sulla superficie degli oociti di *Arbacia punctulata* ci siano recettori specie-specifici per gli spermatozoi. La percentuale di oociti fertilizzati di questa specie, proporzionale al numero degli spermatozoi presenti, non risente della presenza di uova, o di membrane preparate dalle uova, di *Strongylocentrotus purpuratus* (altro *purple sea urchin*). Al contrario, membrane preparate dagli oociti di *Arbacia punctulata* inibiscono

quantitativamente la fertilizzazione delle uova della propria specie da parte degli spermatozoi della specie medesima. Varie evidenze sperimentali indicano che questa inibizione è dovuta alla presenza di una glicoproteina, associata alla membrana, che riconosce e lega gli spermatozoi, prevenendone l'interazione con il recettore specie-specifico presente sulla superfice degli oociti. Prima evidenza: uova pretrattate con tripsina non vengono fertilizzate, benchè possano essere attivate con A23187 (calcimicina[4]), ionoforo del Ca^{2+}. Inoltre, membrane preparate da uova pretrattate con tripsina non inibiscono la fertilizzazione degli oociti. Seconda evidenza: recettori, isolati in forma solubile dalle membrane di superficie degli oociti, si legano agli spermatozoi, impedendo loro di fertilizzare gli oociti; l'inibizione da parte di recettori solubili è specie-specifica. Terza evidenza: il recettore solubile di superficie si lega alla concanavallina[5] A5-Sefarosio e, quarta evidenza, gli oociti pretrattati con concanavallina A non riescono ad essere fertilizzati. La specificità dell'inibizione, e l'effetto di tripsina e concanavallina A sulle uova intatte, fanno pensare che il recettore degli spermatozoi sia una macromolecola di superficie degli oociti. Inoltre, la sensibilità del recettore alla tripsina e la sua capacità di legarsi alla concanavallina A indicano che questo recettore è una glicoproteina (Schmell, 1977).

La "membrana di fertilizzazione"

Le ricerche di Otto Heinrich Warburg (1883-1970), sul consumo di ossigeno nelle uova fertilizzate di riccio di mare, dimostrarono che, dopo la fertilizzazione, il tasso di respirazione aumenta di ben 6 volte e che Fe^{2+} è essenziale per lo sviluppo dello stadio larvale (Warburg, 1908). Queste ricerche, propedeutiche a quelle che lo portarono a studiare il metabolismo dei tumori e, in particolare, la respirazione delle cellule tumorali, valsero a Warburg ben 46 nomination al premio Nobel in 9 anni, a partire dal 1923; 13 di queste, presentate nel 1931, gli valsero il conferimento del premio Nobel per la Fisiologia o la Medicina nello stesso anno, con la motivazione: *"…per la scoperta della natura e del meccanismo d'azione dell'enzima respiratorio"*. Proseguendo nelle sue ricerche, Warburg individuò, come differenza fondamentale tra le cellule sane e quelle cancerose, la velocità di flusso della glicolisi, che in queste ultime può essere fino a 200 volte superiore a quella delle cellule dei tessuti sani: tale evento, confermato anche da ricerche più recenti, è tuttora indicato come effetto Warburg (elevato consumo locale di ossigeno, che genera una carenza di ossigeno nelle cellule tumorali, con conseguente innalzamento dei livelli della glicolisi).

Pochi anni dopo le scoperte di Warburg sulla respirazione cellulare delle uova di riccio di mare, Kite G. L. studiò e descrisse la cosidetta "membrana di fertilizzazione" (MdF) degli oociti di *Arbacia punctulata*, facendo anche un'analisi critica delle metodologie e dei risultati ottenuti dai ricercatori contemporanei, che riteneva inadeguate a determinarne l'esatta natura. Le sue ricerche sono state decisive per l'avanzamento degli studi nel campo della fertilizzazione degli oociti degli echinodermi e propedeutiche a vari filoni di ricerca (Kite, 1912).

Le normali uova di *Arbacia* non fertilizzate, e degli echinodermi in generale, sono ricoperte da uno strato di gelatina soffice e invisibile (*jelly coat*) che svolge varie funzioni: 1) grazie alla sua viscosità, impedisce a troppi spermatozoi di raggiungere contemporaneamente l'oocita, 2) le proteine presenti nello strato gelatinoso iniziano la reazione acrosomiale negli spermatozoi, in modo da prepararli alla fertilizzazione dell'oocita e 3) fornisce una sorta di "*shock absorber*" per prevenire danni provocati all'oocita dall'azione dell'onda suscitata dal flagello dello spermatozoo. Lo spessore di questo strato gelatinoso è di circa 23 μ; sottostante, aderente al citoplasma, c'è la membrana vitellina, resistente ed elastica (spessa 1,9 μ, con indice di rifrazione così vicino a quello dell'acqua di mare, da risultare invisibile). Dal punto di vista morfologico, la membrana vitellina è l'unica membrana dell'oocita di *Arbacia* ed è letteralmente incollata alla superficie esterna del citoplasma. Durante la reazione dell'o-

ocita allo spermatozoo, si verificano drastici cambiamenti nella membrana vitellina e sulla superficie del citoplasma, mentre il cambiamento della forma dello strato gelatinoso è minimo; 60-90 secondi circa, dopo il rimescolamento di spermatozoi con uova, si verifica un netto ispessimento della membrana vitellina, che può raggiungere i 9 μ di spessore, mentre il suo indice di rifrazione cambia nettamente, tanto da diventare visibile al normale esame al microscopio. In alcuni oociti, il rigonfiamento si completa in 1 minuto circa, ma 3-5 minuti sono solitamente necessari per raggiungere i valori massimi (9 μ nel punto più spesso) del rigonfiamento di questa struttura. Circa 1-5 minuti dopo l'inseminazione degli oociti, la superficie del citoplasma si rigonfia e cambia il suo indice di rifrazione: in un minuto circa, il rigonfiamento è completo e raggiunge 1 μ di spessore: questo è il ben noto *hyaline plasma layer*. All'esame al microscopio, la cosiddetta MdF delle uova di *Arbacia* consiste di 3 parti: 1) la parte interna della gelatina che ricopre l'oocita, che è andata incontro a un cambiamento dell'indice di rifrazione, 2) la membrana vitellina ispessita e 3) il sottile strato superficiale ialino, altamente rifrattivo, del citoplasma, tuttora strettamente adeso alla membrana vitellina. Quest'ultima, edematosa, è più soffice ed elastica di quella degli oociti non fertilizzati. Il protoplasma si contrae e lo strato ialino assume spesso l'aspetto di processi simil-pseudopodiali del citoplasma. Non ci sono dubbi circa la natura di questa struttura: è la superficie rigonfiata del citoplasma ed entra nella formazione della larva di *Arbacia punctulata*. Questa reazione è comune agli oociti dei policheti marini del genere *Chaetopterus* e del mollusco bivalve *Cumingia*, nei quali, però, il rigonfiamento della membrana vitellina è più tardivo, raggiungendo i valori massimi solo 20-30 minuti dopo l'inseminazione delle uova.

L'analisi della reazione dell'oocita di *Arbacia* allo spermatozoo è stata oggetto di vari studi. Lo spermatozoo è stato rimosso dalla membrana vitellina dopo che aveva causato la reazione di attivazione. In base alle evidenze ottenute, Kite G. L. concludeva che la funzione primaria della tanto discussa (al tempo) reazione degli oociti di *Arbacia* agli spermatozoi, è impedire la polispermia (entrata di più spermi nella cellula uovo). Negli stessi anni, Glaser O., nel corso di ricerche sull'energia dello sviluppo, affrontò in dettaglio il problema sull'assorbimento dell'acqua in vari stadi dell'embriogenesi e, per studiare alcune fasi di questi studi, le uova di *Arbacia punctulata* gli parvero particolarmente adatte. Così, scoprì che, messe in varie concentrazioni di acqua marina, queste uova si comportavano come previsto; in acqua marina al 25% (25 parti di acqua marina + 75 parti di acqua distillata), compariva la MdF e questo processo prendeva forma da un uovo all'altro, dopo soli 30 secondi circa, a temperatura ambiente (Glaser, 1913).

All'inizio degli anni '40 del secolo scorso, il problema della MdF e della sua formazione era ancora oggetto di acceso dibattito, visto che J. Runnström, L. Monné, L. Broman e altri erano tuttora attivi in questo ambito di ricerca. Il primo, già nel 1928 e poi ancora nel 1944, pubblicò più lavori sull'argomento, precisando che la MdF presenta un duplice indice di rifrazione, negativo in direzione radiale, non osservabile sulla superficie delle uova non fertilizzate. Durante il sollevamento della membrana, la birifrangenza aumenta fino a raggiungere il valore normale (ritardo M 12 mμ). Gli oociti non fertilizzati, trasferiti in soluzione ipertonica (2 ml di acqua di mare+0.6 ml di NaCl 2÷5 N), formano, talora, una membrana più o meno granulare, la cui birifrangenza è considerevolmente più bassa di quella della normale MdF. Questi granuli, simili ai granuli corticali degli oociti non fertilizzati, si formano alla maturazione dell'oocita e scompaiono al momento della fertilizzazione; sono facilmente visibili in sezioni di uova mature non fertilizzate, fissate nella soluzione di Fleming e colorate con ematossilina.

Sperma di riccio di mare è stato surgelato, disidratato sotto vuoto ed estratto con metanolo; il residuo secco è stato trattato per 3 minuti con acqua marina a 90°C. L'estratto, così ottenuto (contenente 0,5÷0,7 mg/mL), ha interferito, anche a diluizioni considerevoli (1:200÷1:300), con la formazione di una normale MdF, senza inibire l'entrata degli spermatozoi e la copulazione dei due pronuclei. Però, mentre la divisione dei nuclei è proceduta regolarmente, la segmentazione del

citoplasma risultava inibita in differenti entità. L'inibizione della formazione della MdF si verifica in molti gradi diversi - in base alla concentrazione dell'estratto metanolico dello sperma - che vedono coinvolti l'aspetto (granulare, liscio o rugoso), il doppio indice di rifrazione, l'aderenza alla superficie dell'oocita, l'entità dello spazio peri-vitellino. Nella 1a fase, nessuna membrana si separa dalla superficie dell'oocita; persino quando gli oociti sono trasferiti in una soluzione ipertonica, nessuna membrana si rende visibile; nella 2a fase, si forma una membrana, ma lo spazio perivitellino della superficie dell'oocita è molto stretto e, in soluzione ipertonica, la membrana appare completamente separata dalla superficie dell'oocita: è una membrana granulare e il suo doppio indice di rifrazione è piuttosto basso, la sua duplice rifrazione ammontando soltanto a circa la metà del valore normale. Nelle uova con membrane granulari non si distinguono granuli corticali, tuttavia i granuli della membrana si colorano esattamente nello stesso modo dei granuli presenti sulla superficie delle uova non fertilizzate. Nella 3a fase, lo spazio perivitellino ha la sua ampiezza normale, la membrana è ripiegata o arricciata, ma non si vedono granuli e la doppia rifrazione non differisce da quella di una normale membrana liscia; si osservano stadi intermedi tra la 2a e la 3a fase, nei quali parte della membrana può essere granulare e parte arricciata senza granuli visibili. Il duplice indice di rifrazione della MdF raggiunge il suo valore normale solo quando i granuli sono stati incorporati nella membrana; nella 4a fase, in soluzioni più diluite dell'estratto metanolico di sperma, può comparire una normale membrana liscia sollevata. Tuttavia, possono esistere situazioni intermedie, nelle quali parte della membrana è arricciata o addirittura granulare, mentre altre parti sono apparentemente lisce e normali.

È ragionevole supporre che, nel loro insieme, i diversi aspetti assunti dalla "MdF", nelle diverse fasi evolutive, rappresentino i differenti stadi della sua normale formazione fisiologica. Dati a supporto di questa asserzione vengono da un esperimento nel quale oociti non fertilizzati di un altro echinoderma (*Echinocardium cordatum*, *sea potato* (fig. 6) - riccio di mare della Famiglia *Loveniidae*, che popola regioni sub-tidali, in mari temperati e vive seppellito in fondali sabbiosi - sono stati trasferiti in una miscela di 7 parti di acqua marina e 1 parte di siero di coniglio o di pecora. In questa miscela, si formano normali membrane perfettamente lisce, ma il processo passa gradualmente attraverso le 4 fasi suddette e, solo dopo circa 15 minuti dal suo inizio, si completa la formazione di membrane perfettamente lisce. A fecondazione avvenuta, ha inizio la ritrazione della "MdF" a partire dal punto di entrata dello spermatozoo e, da quel punto, si diffonde sulla superficie dell'oocita, come un'onda. Circa 10 minuti dopo la fertilizzazione, lo strato ialino diventa visibile sulla superficie dell'oocita normale. Ovviamente, la formazione del bordo ialino e quella dello strato ialino sono processi assolutamente analoghi con analoghi meccanismi. La cosiddetta "membrana vitellina" dell'oocita non fertilizzato non è identica alla MdF, rappresentandone solo una parte (Runnström, 1944).

Ruolo dell'ovoperossidasi nella fertilizzazione

Uno degli aspetti della fertilizzazione è l'alterazione dello strato vitellino da parte di componen-

Fig. 6. *Echinocardium cordatum* (foto iktebath - Fotolia.com).

ti rilasciati dall'oocita, finalizzata alla produzione di una MdF rialzata, con legami covalenti incrociati a reticolato, resistente e insolubile. Legami incrociati e resistenza sono dovuti alla produzione di residui di- e tri-tirosinici originati dall'ossidazione di residui tirosinici legati a proteine, in presenza di ovoperossidasi (NADPH-ossidasi). L'indurimento della MdF, evidenziato dalla perdita di solubilità in ditiotreitolo 50 mM, è ostacolato dagli inibitori noti di molte perossidasi. L'ovoperossidasi, responsabile della formazione dei robusti reticolati di legami incrociati che costituiscono una rete di protezione verso l'entrata di spermatozoi soprannumerari, è un enzima rilasciato dall'oocita al momento della fertilizzazione, ed è inibito dalle stesse sostanze, e alle stesse concentrazioni, che inibiscono l'indurimento della MdF; tra queste sono KCN, 3-amino-1,2,4-triazolo, NaN3, fenilidrazina, $K_4Fe(CN)_6$, Na_2SO_3 e glicina-etil estere. Inoltre, tiramina e N-acetil tirosina inibiscono l'indurimento della membrana, a differenza della O-metil-tirosina. In idrolizzati acidi di MdF isolate, si trovano residui di- e tri-tirosinici ossidati, identificati mediante cromatografia su colonna di cellulosa-SO_4 e con cromatografia su strato sottile; l'analisi della sequenza amminoacidica ha permesso di stimare che si formi un legame incrociato di tirosina/55.000 dalton di proteine. Concludendo, questi risultati suggeriscono che l'ovoperossidasi produca l'indurimento della MdF, che blocca l'entrata di altri spermi, catalizzando i legami trasversali di residui tirosinici. Essendo spermicide, le perossidasi esplicano anche una funzione secondaria: l'uccisione degli spermatozoi che si trovano nelle vicinanze dell'oocita fertilizzato (Foerder, 1977).

Partenogenesi sperimentale in *Arbacia punctulata*

Anche nelle ricerche sulla partenogenesi sperimentale, *Arbacia punctulata* è modello animale di elezione. Varie soluzioni di cloruri di Na^+, K^+ e Mg^{2+} sono state usate per attivare oociti di *Arbacia punctulata*; dalle uova attivate con $MgCl_2$, sono stati ottenuti, per la prima volta, parteno-plutei. Un altro approccio ha prodotto risultati interessanti: oociti di questo echinoderma sono stati attivati artificialmente con acqua di mare ipertonica. Una volta attivati, questi oociti sono andati incontro a reazioni corticali, non caratterizzate da una progressione ondulatoria come accade, invece, per gli oociti fertilizzati naturalmente. Si potevano osservare granuli corticali, disseminati in posizioni casuali alla superficie degli oociti, che si addensano in spazi separati da grandi proiezioni citoplasmatiche. Granuli corticali che non avevano reagito, e ribosomi si trovavano nella matrice che comprendeva le ampie proiezioni citoplasmatiche. Non si è formato il classico cono di fertilizzazione. Il successivo rilascio di granuli corticali addizionali ha portato alla formazione di uno spazio perivitellino continuo 15 minuti dopo l'attivazione; dopo circa ulteriori 70 minuti, si osservava un'organizzazione di lamelle anulate, un reticolo endoplasmico liscio e microtubuli disposti attorno a un centriolo, prima della divisione cellulare. Prima della rottura della membrana nucleare, c'è stata una fase caratterizzata da una striscia, composta da un nucleo centrale di lamelle anulate, compresa tra strutture del reticolo endoplasmico e componenti vescicolari. La condensazione della cromatina è stata seguita dalla formazione di un apparato mitotico. Non sono stati rinvenuti centrìoli nell'oocita maturo, ma questi erano presenti, dopo l'attivazione, prima della prima divisione cellulare, nell'embrione allo stadio di 4 cellule, nell'embrione multicellulare e nella blastula. Oltre il 50% degli oociti attivati artificialmente si è sviluppato fino allo stadio di pluteo (Sachs, 1970) (fig. 1).

Note

1. Oolemma è la membrana che avvolge l'oocita.
2. Activation calix: immediatamente dopo l'attivazione dell'oocita da parte dello spermatozoo, l'involucro primario dell'oocita si stacca dall'oolemma, formando l'activation calix.
3. Lo sperm-aster è un centrosoma con raggi astrali nel citoplasma di un uovo fertilizzzato; portato dallo spermatozoo penetrato nell'oocita, dà origine al fuso mitotico della prima divisione dello zigote.
4. La calcimicina, o A23187, è un trasportatore ionico che forma complessi stabili con cationi divalenti. È anche conosciuta come "ionoforo del calcio", "antibiotico A23187" e "ionoforo del calcio A23187". È prodotta dalla fermentazione di Streptomyces chartreusensis.
5. Concanavallina A è una lectina, carbohydrate-binding protein, proteina mitogena ottenuta dalla pianta Canavalia ensiformis. È stata la prima lectina a essere purificata; la sua struttura tridimensionale contiene 283 residui amminoacidici.

Bibliografia

- Anderson, E., 1968; Oocyte differentiation in the sea urchin Arbacia Punctulata, with particular reference to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction. The J. of Cell Biol., vol. 37: pp. 514-539
- Failla, P. M.,1965; Recovery from division delay in irradiated gametes of Arbacia punctulata. *Radiat. Res*., vol. 25: pp. 331-340
- Foerder, C. A., and Shapiro, B. N., 1977; Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,74: pp. 4214-4218
- Glaser, O., 1913; On inducing development in the sea-urchin (Arbacia punctulata) togheter with considerations on the initiatory effect of fertilization. *Science,* vol. 38: pp. 446-450
- Harrington, M., 2014; Sea urchins point the way. Laboratory Animal Europe. Vol 14: p. 39
- Henson, J.H, and Schatten, G. 1983; Calcium regulation of the actin-mediated cytoskeletal transformation of sea urchin coelomocytes. *Cell Motil*., vol. 3: pp. 525-534
- Inamdar, M.V., Kim, T., Chung, Y. K., Was, A. M., Xiang, X., Wang, C. W., Takayama, S., Lastoskie, C. M., Thomas, F. I., Sastry, A. M., 2007; Assessment of sperm chemokinesis with exposure to jelly coats of sea urchin eggs and resact: a microfluidic experiment and numerical study. *J. Exp. Biol., v*ol. 210 (Pt 21): pp. 3805-3820
- Jäntschi, L. and Bolboaca, S.D. 2008; A structural modelling study on marine sediments toxicity. *Mar. Drugs,* vol. 6: 372-388
- Kabat-Zinn, J., and Singer, R. H., 1981; Sea urchin tube feet: unique structures that allow a cytological and molecular approach to the study of actin and its gene expression. *J. Cell Biol*., vol. 89: pp. 109-114
- Kanungo, J., 2002; Prolonged incubation in seawater induces a DNA-dependent protein phosphorylation activity in Arbacia punctulata eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., vol. 294: pp. 667-671
- Kite, G. L.,1912; The nature of the fertilization membrane of the eggs of the sea urchin (Arbacia punctulata). *Science*, vol. 36: pp- 562-564
- Kominami, T. and Takata, T., 2008; Sea urchin embryo. A Model System for Analyzing Cellular Activities During Early Development. From: Sourcebook of Models for Biomedical Research. Humana Press. Inc., Totowa, NJ, USA
- Lillie, F. R., 1915; "The Fertilizing Power of Sperm Dilutions of Arbacia". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* vo1.: pp. 156-160
- Longo, F. J. and Anderson, E., 1970; The effects of nicotine on fertilization in the sea urchin, *Arbacia punctulata*. He J. of Cell Biol., vol. 46: pp. 8o8-825

– National Research Council (NRC). From Monsoons to Microbes: Understanding the Oceanìs Role in Human Health 83-96 (National Academy Press, Washington, D. C., 1999)
– Rudolph, A., et al., 2008; Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. *Environ. Monit. Assess*., vol. 155: pp. 419-429
– Rulon, O., 1947;The modification of developmental patterns in Arbacia eggs with malonic acid. *Anat. Rec*., vol. 99: p. 652
– Runnström, J., et al., 1944; Mechanism of formation of the fertilization membrane in the sea urchin egg. *Nature*, vol. 153: pp. 313-314
– Sachs, M. I., and Anderson, E., 1970; A cytological study of artificial parthenogenesis in the sea urchin Arbacia punctulata. *J. Cell Biol*., vol. 47: pp. 140-158
– Schmell E., et al., 1977; Identification of a sperm receptor on the surface of the eggs of sea urchin Arbacia punctulata. The J. of Cell. Biol., vol. 72: pp. 35-46
– Warburg, O. H., 1908; Beobachtungen über die Oxydationsprozesse in Seeigelei. Hoppe-Seyler Z. *Physiol. Chem*., vol, 57: pp. 1-16
– Zimmerman, A. M., and Marsland, D., 1964; Cell division: effects of pressure on the mitotic mechanisms of marine eggs (Arbacia punctulata). *Exp. Cell Res*., vol. 35: pp. 293-302

ARBACIA PUNCTULATA E ALTRI ECHINODERMI, MODELLI ANIMALI IN RICERCHE SULL'RNA DURANTE LO SVILUPPO EMBRIONALE, SUI TOPOSOMI, SULLA CHEMOTASSI E SUL RUOLO DI RESACT E SPERACT

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Premessa

Questo capitolo tratta del coinvolgimento dell'RNA nelle fasi dello sviluppo embrionale di *Arbacia punctulata* (fig. 1), della funzione dei toposomi e della fisiologia della chemotassi, con particolare attenzione al ruolo dei polipetidi presenti nello strato gelatinoso che ricopre gli oociti e i loro recettori sugli spermatozoi.

Vecchio e nuovo RNA durante l'embriogenesi di *Arbacia punctulata*

Sia l'RNA dell'oocita prima della fertilizzazione, che l'RNA sintetizzato dopo la fecondazione, sono coinvolti nell'embriogenesi. La maggior parte della riserva di RNA della cellula uovo è ribosomiale e la capacità dei ribosomi dell'oocita di partecipare alla sintesi proteica è limitata dalla mancanza di RNA messaggero (mRNA). Dopo la fertilizzazione, il ritmo della sintesi ribosomiale di proteine aumenta, presumibilmente perché diventa disponibile mRNA di nuova sintesi o, in qualche modo, viene reso disponibile mRNA già esistente. Determinazioni biochimiche indicano che la quantità di RNA totale praticamente non cambia durante le fasi iniziali dello sviluppo. Tuttavia, è stata rilevata incorporazione di vari precursori radioattivi (basi azotate) nell'RNA di embrioni di ricci di mare: se tale incorporazione indicasse un semplice *turnover* dell'RNA, vorrebbe dire che la sintesi netta effettiva di una delle due componenti dell'RNA (precedente alla fertilizzazione e di neosintesi durante lo sviluppo) avviene a spese dell'altra.

Le maggiori componenti dell'RNA degli oociti di *Arbacia punctulata* sono state caratterizzate con l'analisi della sedimentazione in gradiente di saccarosio e il loro destino è stato esaminato, insieme alla natura dell'RNA di nuova sintesi, nei vari stadi dello sviluppo embrionale (Nemer, 1963). Il *pattern* di sedimentazione dell'incorporazione a seguito di una breve esposizione a precursori radioattivi (*pulse experiment*) è stato confrontato col

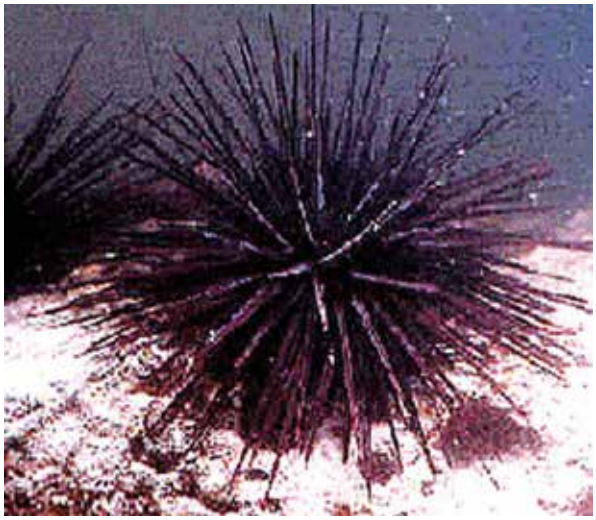


Fig. 1. *Arbacia punctulata*

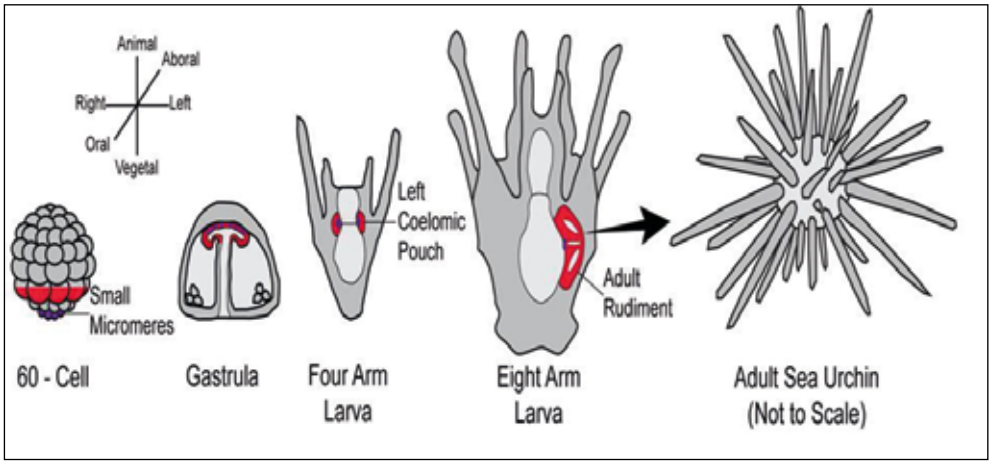


Fig. 2. Sviluppo embrionale di riccio di mare: dalla morula all'individuo adulto

pattern alla fine di una successiva incubazione in presenza dello stesso precursore non marcato (*chase experiment*). La porzione di RNA radioattivo del *pulse,* destinato a componenti stabili, sarà ritrovata associata a quelle porzioni destinate al *chase*. D'altra parte, qualunque RNA degradato rapidamente è rilevabile solo dopo un *pulse* e non alla fine di un *chase*. Il corso dell'embriogenesi di *Arbacia punctulata* è segnato da impressionanti cambiamenti nel carattere dell' RNA *pulse* (RNA*p*) e dell'RNA *chase* (RNA*c*). Circa il 6% dell'RNA totale degli oociti sedimenta in gradiente di saccarosio a 4S; questo valore può crescere di 2 - 3 volte, quando gli stadi di blastula e gastrula sono stati raggiunti. Un netto aumento nella concentrazione di *transfer* RNA durante lo sviluppo è stato dedotto, indirettamente, dalla misura della sintesi di polipeptidi da parte di preparazioni ribosomiali *cell-free*, ottenute da ricci di mare di altre specie. Lo sviluppo embrionale di *Arbacia punctulata* procede per fasi distinte (figg. 1a/b), ognuna con un suo caratteristico *pattern* di sintesi dell'RNA, mentre *pattern* di sedimentazione distinti caratterizzano l'RNA di rapida sintesi, durante le prime 3 fasi dello sviluppo embrionale. RNA*p* e RNA*c*, prima fase, nell'uovo non fertilizzato: prima della fertilizzazione, nucleosidi sono meno utilizzati rispetto a dopo la fertilizzazione, tuttavia, la loro incorporazione nell'RNA delle uova non fertilizzate è rilevabile. Le caratteristiche di questa incorporazione sono state studiate con analisi della sedimentazione dell'RNA ottenuto da oociti incubati con ^{3}H-uridina per 20 minuti *pulse*, in parte poi incubati anche con uridina non marcata per 4 ore *chase*. Dopo il *pulse*, la radioattività è distribuita attraverso il gradiente, in picchi di circa 4, 17 e 22S. Dopo il *chase*, persiste la stessa distribuzione, ma con un piccolo aumento dell'attività specifica. Nell'oocita non fertilizzato questo *pattern* persiste ad un *chase* di 4 ore, indicando un elevato grado di stabilità, mentre in un *chase* di uova fertilizzate, l'incorporazione in RNA stabile di diversi comportamenti di sedimentazione oscura il *pattern* di *pulse*, indicando che l'RNA*p* è stato degradato metabolicamente e che la sintesi di questo tipo di RNA è diminuita. Indipendentemente dal suo grado di stabilità, questo RNA*p* può essere il primo messaggero, destinato a inaugurare gli eventi dell'embriogenesi. La sintesi di questo mRNA potrebbe spiegare la sintesi proteica, molto bassa, ma pur sempre rilevabile, nelle uova non fertilizzate. La continua produzione di questo mRNA, e il suo uso dopo la fertilizzazione, possono soddisfare la necessità di sintesi proteica durante la divisione cellulare e spiegare l'impennata di questa sintesi, registrata dopo la fertilizzazione. Seconda

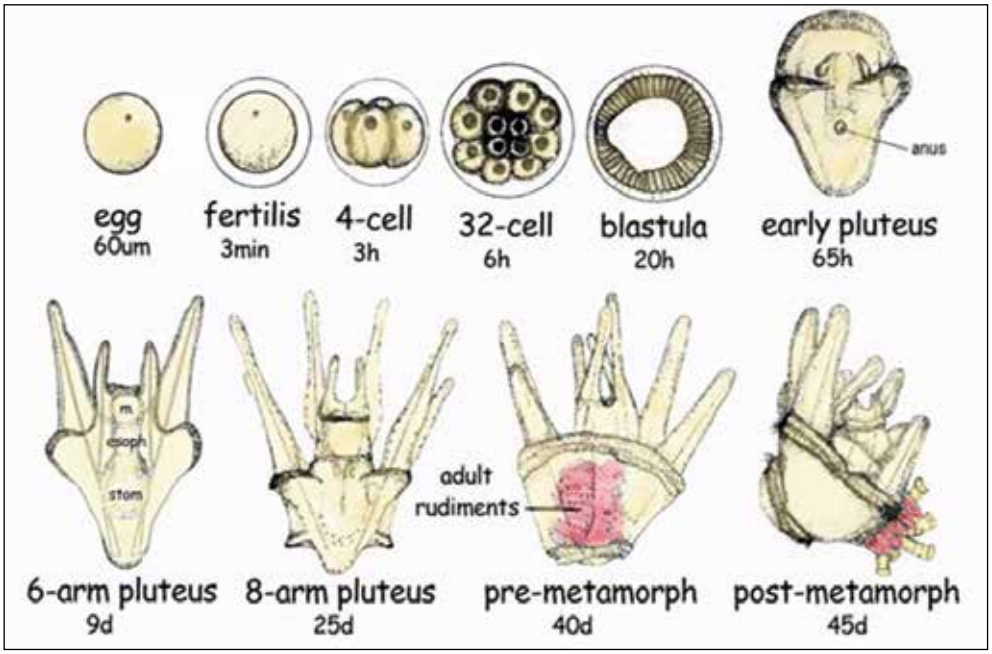


Fig. 3. Sviluppo embrionale di riccio di mare: dall'oocita non fecondato allo stadio post-metamorfosi

fase: stadio di pre-gastrula, divisione di 8-16 cellule. Durante gli stadi precoci della segmentazione, la natura dell'RNA*p* va incontro a una transizione verso un *pattern* che presenta un picco predominante di circa 10S. Questo può rappresentare una transizione tra la sintesi di mRNA modellati dal genoma materno e da essere impiegati prima e subito dopo la fertilizzazione, e quella di mRNA destinati ad essere coinvolti nei processi dello sviluppo embrionale. Questo *pattern* di RNA*p*, che compare in tutti gli stadi pre-gastrula (figg. 2 e 3), presenta un progressivo cambiamento evolutivo, per cui il picco si allarga verso la regione più pesante del gradiente. Questo picco può contenere un gruppo di mRNA le cui dimensioni medie aumentano durante questa fase dello sviluppo, nella quale, forse, l'embrione "impara parole più lunghe". Questi mRNA possono preannunciare il differenziamento. Terza fase: stadi post-gastrula (figg. 2 e 3). Un cambiamento pronunciato dell'RNA*p* si verifica dopo la gastrulazione: la forma finale assunta dall'RNA*p* in questa progressione è presente in tutti gli stadi post-gastrula. Nel *pulse* di una gastrula di 45 ore, la regione 10S non predomina più nell'entità dell'incorporazione; al contrario, il suo *pattern* di sedimentazione è polidisperso lungo tutto il gradiente di saccarosio, con gran parte della radioattività (*pulse experiments*) superiore a 30S e coincidente con una sintesi di RNA ribosomiale nettamente aumentata, com'è dimostrato dall'incorporazione di precursori marcati dell'RNA, in *chase experiments*. La brusca crescita di RNA ribosomiale, osservata in *chase experiment* fatti con gastrule, accompagnata dalla comparsa di una consistente radioattività nell'RNA*p* maggiore di 30S, è in accordo con l'ipotesi che parte dell'RNA di rapida e intensa sintesi sia il precursore dell'RNA ribosomiale. Negli stadi di prisma (60 ore) e di *pluteus* (72 ore) (fig. 3) il *pattern* di incorporazione di RNA*p* è simile a quello visto nella gastrula. Dopo *chase experiments*, una gran quantità di attività si ritrova nel maggiori componenti di RNA. Riassumendo, *pattern* di sedimentazione

nettamente differenti sono visualizzati dall'RNA rapidamente sintetizzato nelle tre fasi precoci dello sviluppo embrionale: il *pattern* delle uova non fertilizzate, e di quelle appena fertilizzate, presenta 3 picchi caratteristici approssimativamente di 4, 17 e 22S; un picco di circa 10S prevale negli stadi di pre-gastrula e il *pattern* della post-gastrula, polidisperso, ma con gran parte della radioattività superiore a 30S, coincide con una sintesi nettamente aumentata di RNA ribosomiale, rilevata tramite l'incorporazione in esperimenti *chase* (Nemer, 1963).

I toposomi delle cellule embrionali di *Arbacia punctulata*

Gli embrioni dei ricci di mare sono particolarmente adatti allo studio delle interazioni cellula-cellula durante l'embriogenesi: la rimozione degli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} induce la dissociazione dell'embrione nelle singole cellule che lo compongono, mentre, in seguito al ripristino di questi ioni, le cellule riaggregano spontaneamente, per riformare un normale embrione in sviluppo. La riaggregazione è bloccata, in modo strettamente specie-specifico, da anticorpi, o loro frammenti FAB (*fragment, Antigen Binding*), contro membrane purificate o contro estratti butanolici ottenuti da membrane purificate. Ugualmente inibitori sono gli anticorpi contro i componenti estratti con butanolo 2,5% (v:v), in modo non citolitico, da cellule vive. L'aggiunta delle proteine solubilizzate dal butanolo da membrane purificate, o dalla superficie cellulare, neutralizzano gli anticorpi inibitori, stimolano la riaggregazione e ricostituiscono le cellule che erano state rese incompetenti per riaggregazione dagli estratti butanolici non citolitici. L'adesione delle cellule nella blastula di ricci di mare è mediata da un complesso glicoproteico specie-specifico 22S, consistente inizialmente in 6 sub-unità di 160 kDa, che sono processate proteoliticamente durante lo sviluppo. La rimozione non citolitica delle particelle 22S dalla superficie delle cellule, con butanolo 2.5% o con tripsina, rende le cellule dissociate incompetenti per riaggregazione, mentre l'aggiunta delle particelle 22S ripristina sia la riaggregazione che lo sviluppo. Anticorpi policlonali contro il complesso 22S prevengono la riaggregazione delle cellule dissociate in modo specie-specifico, mentre anticorpi monoclonali "chiazzano" le strutture della superficie cellulare secondo un *pattern* compatibile con un codice che specifica la posizione di ogni singola cellula nell'embrione, tramite una combinazione unica di subunità nelle sue particelle di adesione cellulare. L'esistenza di particelle simili negli embrioni di *Drosophila* e di anfibi suggerisce che queste glicoproteine complesse siano una classe diffusa, attraverso i diversi *phyla*, di organelli, i toposomi, che negli embrioni mediano l'adesione cellulare ed esprimono informazioni posizionali [Noll, H., 1985].

Ai toposomi è stata attribuita una funzione guida delle cellule nei processi morfogenetici, esercitata attraverso la combinazione delle unità proteiche che lo compongono. Struttura e funzioni del toposomi sono state descritte di recente: si tratta di una transferrina che lega il calcio, priva di ferro, primo membro di una nuova classe di proteine di adesione. Sono state determinate: 1) la struttura amminoacidica del precursore del toposoma, 2) mediante degradazione di Edman[1], le sequenze degli amminoacidi N-terminali della glicoproteina esamerica matura presente nell'oocita e 3) la sequenza dei suoi frammenti modificati, ottenuti per via proteolitica, necessari per lo sviluppo embrionale oltre lo stadio di blastula. Gli *approximate C-termini* dei frammenti sono stati determinati con analisi combinata di spettrometria di massa e migrazione in gel riducenti, prima e dopo de-glicosilazione. Questo nuovo membro della famiglia delle transferrine mostra particolari aspetti che spiegano la sua evoluzione adattativa allo sviluppo e alla funzione adesiva delle cellule negli embrioni dei ricci marini: 1) una proteasi che inibisce il dominio WAP[2], 2) un'inserzione di 280 amminoacidi, nel lobo C-terminale, privi di cisteina e 3) un'estensione residua C-terminale di 240 aa, contenente una cistina modificata con struttura *knot*, in multi-subunità di glicoproteine esterne di superficie cellulare. La rimozione proteolitica del dominio terminale WAP origina il toposoma ma-

turo presente sugli oociti. La struttura *knot* della cistina modificata stabilizza i trimeri legati alla cellula subito dopo la dissociazione calcio-dipendente delle cellule legate all'esamero. Sono state determinate le posizioni dei tagli regolati evolutivamente nelle inserzioni prive di cisteina, che producono i frammenti osservati come si è detto. Questi frammenti rimangono legati alla particella esamerica 22S *in vivo* e sono rilasciate solo dopo trattamento del toposoma purificato con agenti riducenti. Inoltre, risultano prodotti alcuni frammenti minori, solubili, dotati di possibili funzioni di segnale. Il confronto delle sequenze dei toposomi di 5 specie di ricci marini rivela la posizione del sito di contatto cellula-cellula, bersaglio di anticorpi specie-specifici che dissociano le cellule dell'embrione. L'albero evoluzionistico (filogenetico) delle 2-, 1-, e 0-transferrine ferriche implica la loro evoluzione da un disegno allosterico basale attivato da cationi, modificato per servire funzioni multiple [Noll, H., 2007].

Comportamento chemotattico degli spermatozoi di *Arbacia punctulata* e di altri Echinodermi

Gli eventi che si verificano durante la chemotassi degli spermatozoi sono noti solo in parte. Gli oociti attraggono gli spermatozoi (fig. 4) mediante fattori chimici: da qui il nome, chemotassi, dato al processo. Il/i meccanismo/i che è/sono alla base di questo fenomeno e la relativa strategia comportamentale degli spermatozoi non è/non sono stato/i ancora del tutto chiarito/iti, sia negli invertebrati che nei mammiferi. L'attivazione dei movimenti natatori degli

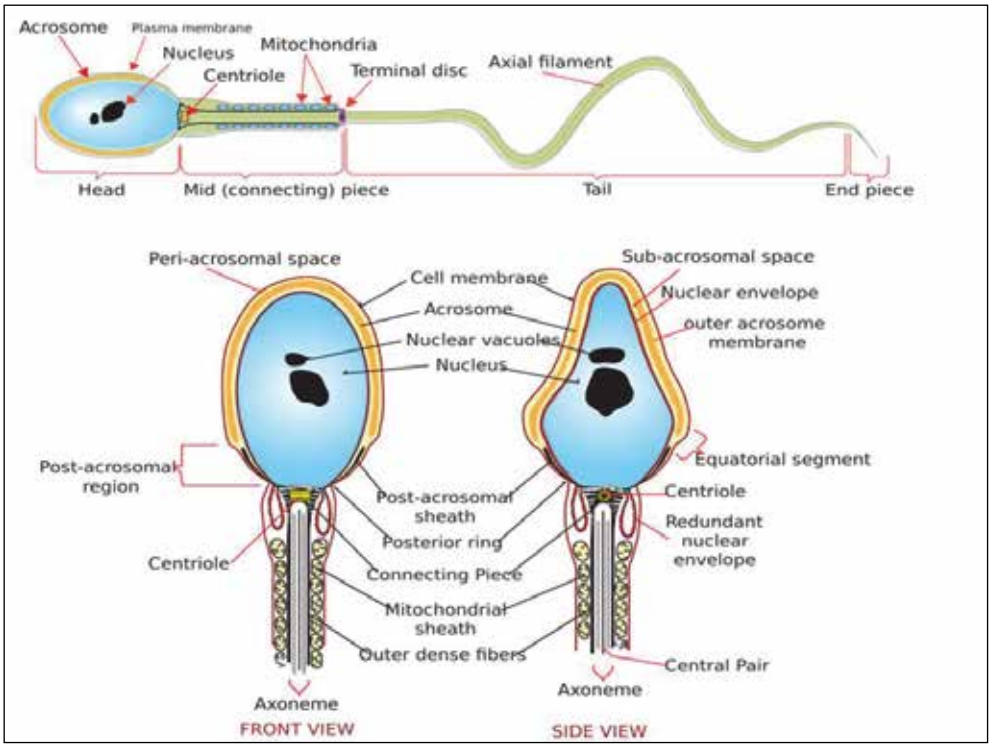


Fig. 4. Spermatozoi di riccio di mare

spermatozoi richiede la previa attivazione di un meccanismo di propulsione. Gli spermatozoi sono attivati attraverso una serie di *step*: 1) il loro contatto con molecole diffusibili, presenti nello/ rilasciate dallo strato di gelatina che avvolge l'oocita, dà inizio alla chemotassi, che è il processo grazie al quale una cellula, che migra/nuota, si muove contro un gradiente positivo di concentrazione di una molecola-guida diffusibile (o fissata su un substrato); 2) lo spermatozoo entra in contatto fisico con lo strato gelatinoso dell'oocita e, nella sua testa (fig. 2), aumenta la [Ca^{2+}] che innesca la reazione acrosomiale. Gli spermatozoi si dirigono, nuotando, secondo traiettorie rettilinee verso la sorgente del/dei chemotattico/i (l'oocita) e virano quando fuggono dall'oocita. E' opinione diffusa che cambiamenti della [Ca^{2+}] intracellulare ne controllino la traiettoria natatoria, ma le evidenze a supporto di quest'ipotesi sono indirette. In spermatozoi, le cui membrane cellulari sono state disgregate da detergenti, la [Ca^{2+}] del medium controlla l'asimmetria del battito flagellare: a bassa [Ca^{2+}], i flagelli battono in modo più simmetrico di quando la [Ca^{2+}] è alta. Così, quando lo spermatozoo nuota contro il gradiente chemotattico (verso l'oocita), con una traiettoria rettilinea, la [Ca^{2+}] è plausibilmente bassa mentre, quando nuota secondo il gradiente, la [Ca^{2+}] dovrebbe diventare alta. Tuttavia, queste sono solo ipotesi, che sembrano incompatibili con i recenti studi sulla dinamica del Ca^{2+} negli spermatozoi di *Arbacia punctulata*, sistema modello per gli studi sulla chemotassi. *Resact*, il chemoattraente di questo riccio, evoca un rapido e transiente aumento della [Ca^{2+}] in spermatozoi in sospensione; la stimolazione dei gameti maschili con *resact* risulta in un aumento transiente dell'asimmetria e del successivo ri-orientamento della direzione del nuoto ("svolta"). Poiché sia l'entrata del Ca^{2+} che la risposta motoria si verificano in una scala temporale simile, è plausibile che l'aumento della [Ca^{2+}] evochi una svolta nella traiettoria natatoria. Questi risultati fanno prevedere che gli spermatozoi dovrebbero fare una svolta, quando nuotano verso la sorgente chemoattraente. Sono stati individuati i differenti "step computazionali" che lo spermatozoo esegue per navigare, portando a compimento positivo la sua migrazione contro il gradiente. Facendo campionamenti dell'ambiente che lo circonda, rimanendo responsivo agli stimoli che arrivano in ritardo e modulando la sua sensibilità mentre si avvicina al suo obiettivo, lo spermatozoo riesce ad "accasarsi" in un oocita distante fino a 4.7 mm, pari a 100x la sua lunghezza. I principali interrogativi ancora privi di risposta sono: 1) come fa lo spermatozoo a regolare la sensibilità dei suoi recettori per resact? E 2) come affrontano, gli spermatozoi, disturbi e interferenze che li circondano e che potrebbero mandarli fuori strada? Per individuare e acquisire nuove conoscenze sul meccanismo che controlla la motilità degli spermatozoi, è stata sviluppata una tecnica molto sensibile basata su un laser-stroboscopio, che permette di registrare la dinamica dei cambiamenti della [Ca^{2+}] nei flagelli degli spermatozoi di invertebrati marini, durante il nuoto. La stimolazione di spermatozoi di *Arbacia punctulata*, con chemotattici o con cGMP intracellulare, évoca *spikes* di Ca^{2+} nel loro flagello. Un singolo *spike* di Ca^{2+} provoca un brusco cambio di direzione della traiettoria, cui segue un periodo di nuoto rettilineo (*"turn-and-run"*). Un treno di *spikes* di Ca^{2+} origina movimenti ripetitivi simili a nodi scorsoi e anelli. Se si mette uno spermatozoo a nuotare in un gradiente chemotattico, gli *spikes* di Ca^{2+} e le funzioni di stimolo sono sincronizzate, suggerendo che il nuoto sia controllato da un preciso *timing* degli *spikes* del Ca^{2+}. È stato identificato un peptide, *asterosap*[3], fattore chemotattico della stella marina *Asterias amurenssis* (fig. 5). Gli *spikes* di Ca^{2+} e il comportamento natatorio degli spermatozoi di *Arbacia punctulata* e di *Asterias amurensis* sono molto simili e permettono di concludere che la *pathway* di segnalazione della chemotassi è altamente conservata in queste due specie di echinodermi, la cui divergenza evolutiva data circa 500 milioni di anni [Böhmer, 2005]. Sono stati isolati, dallo strato gelatinoso degli oociti di *Asterias amurensis*, 12 peptidi chiamati *asterosap*, fattori chemotattici che attivano gli spermatozoi omologhi (della stessa specie) e, in combinazione con ARIS, glicoconiugato nello strato gelatinoso dell'oocita, inducono la reazione acrosomiale[4] (*sperm activating peptide*). Di questi, 11 sono stati caratterizzati strutturalmente mediante analisi della sequenza ammino-

Fig. 5. *Asteria amurensis*

acidica e spettrometria di massa con ionizzazione elettro-spray[5]: sono tetratriacontapeptidi ricchi di residui di glutammina, con un legame intramolecolare -S-S- tra Cys8 e Cys32. Anticorpi di coniglio anti-*asterosap* hanno inibito significativamente la reazione acrosomiale della soluzione di gelatina, che è stata ripristinata con l'aggiunta di *asterosap* [Böhmer, 2005].

Componenti presenti negli involucri esterni dell'oocita, che influenzano il battito flagellare dello spermatozoo e la sua reazione acrosomiale, sono regolati da flussi ionici attraverso la membrana plasmatica. *Asterosap*, agente chemotattico presente nello strato gelatinoso che avvolge gli oociti di *Asterias* (stella marina), causa un aumento transiente della [cGMP] intracellulare, grazie all'attivazione del recettore dell'*asterosap*, guanil-ciclasi della membrana plasmatica del flagello dello spermatozoo, e provoca un aumento della [Ca^{2+}] intracellulare. Usando vari antagonisti dei canali del calcio, è stata chiarita la *pathway* dell'aumento della [Ca^{2+}] indotto da *asterosap*. Fluo-4 AM[6], colorante sensibile al Ca^{2+} e permeabile alle cellule, è stato usato per individuare il canale coinvolto nell'aumento di Ca^{2+}, indotto da *asterosap* negli spermatozoi. Vari antagonisti dei canali del Ca^{2+} di tipo L (canale del Ca voltaggio-dipendente; "L" sta per *long lasting*, ovvero di lunga durata, in riferimento alla durata della sua attivazione), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (antagonista non specifico dei canali del Ca^{2+}) e un antagonista dello *store-operated* Ca^{2+} *channel*[7] (SOC) non inducono risposte significative all'aumento della [Ca^{2+}] indotto da *asterosap*. KB-R7943[8], inibitore selettivo dello scambiatore Na^+/Ca^{2++} (*reverse mode* Na^+/K^+ *exchanger*, NCX(rev)) è risultato, invece, un inibitore efficace. Gli spermatozoi, posti in acqua marina artificiale contenente *asterosap* 100 nM mL^{-1}, nuotano vigorosamente, con movimenti flagellari più simmetrici di quelli dei controlli messi in semplice acqua marina artificiale, e KB-R7943 inibisce in modo significativo il movimento flagellare [Islam, M.S.].

Spermatozoi di invertebrati marini usano il segnale cGMP per trasdurre segnali chemotattici in arrivo in cambiamenti della [Ca^{2+}] nel flagello, che controlla il comportamento natatorio degli spermatozoi durante la chemotassi. La *pathway* di segnalazione, a valle della sintesi di cGMP (guanosina 3',5'-monofosfato) ad opera della guanil-ciclasi, non è del tutto chiarita: in particolare, sono ancora sconosciuti i canali ionici coinvolti nell'influsso di Ca^{2+} e i loro meccanismi di *gating*. Usando coloranti sensibili a *rapid voltage* e tecniche cinetiche, è stata registrata la risposta di voltaggio evocata dal chemotattico in spermatozoi di *Arbacia punctulata*. Il chemotattico évoca una breve iperpolarizzazione, seguita da una depolarizzazione sostenuta. L'iperpolarizzazione è dovuta all'apertura dei canali ionici, regolati dal nucleotide ciclico selettivo per K^+, che si trova nel flagello. L'influsso di Ca^{2+} incomincia all'inizio del *recovery* dall'iperpolarizzazione. La soglia di voltaggio dell'entrata di Ca^{2+} indica un coinvolgimento di canali del Ca^{2+} attivati da basso voltaggio (Ca(v)). Questi risultati sono un modello di trasduzione chemosensoriale in spermatozoi, per mezzo del quale un'iperpolarizzazione indotta da cGMP apre canali Ca(v) grazie a un meccanismo di *recovery* dall'inattivazione ed evidenzia una somiglianza tra meccanismi di trasduzione in spermatozoi e fotorecettori [Strünker, 2006.].

Gli spermatozoi di *Arbacia punctulata* sono così sensibili, che sono in grado di risponde-

re ad una singola molecola di chemotattico rilasciata da un oocita. Il meccanismo sotteso a questa estrema sensibilità è sconosciuto. Eventi cruciali di segnalazione nella risposta degli spermatozoi di questa specie al chemotattico includono la rapida sintesi del messaggero intracellulare cGMP e la conseguente iperpolarizzazione della membrana, che risulta dall'apertura dei canali K^+-selettivi regolati da nucleotide ciclico (*K^+-selective cyclic nucleotide-gated channel*, $CNGK^9$). Usando fotolisi calibrata di *caged*[10] cGMP, è stato dimostrato che, durante la risposta ad una singola molecola di chemotattico, vengono generate circa 45 molecole di cGMP. Il canale CNGK risponde a cambiamenti così minimi di cGMP perché è estremamente sensibile a questo nucleotide ciclico ed è attivato in modo non cooperativo. Come i canali del Ca^{2+} e del K^+ attivati da basso voltaggio, il grande polipeptide CNGK consiste in 4 domini o sub-unità (*repeat*) simili tra loro (*homologous repeat sequences*), assemblate in una struttura pseudo-tetramerica che delimita un poro centrale: il canale ionico. Con l'inattivazione, tramite mutagenesi, di ognuno dei 4 *repeat*, o domini di legame, del nucleotide ciclico, si è scoperto che il legame di una singola molecola di cGMP al dominio 3 è necessario e sufficiente per attivare il canale CNGK. In conclusione, CNGK ha sviluppato un meccanismo di attivazione diverso dall'attivazione di altri canali CNG[11] (*cyclic necleotide-gated ion channel*), che richiedono il legame cooperativo di vari ligandi e operano in un *range* micromolare (μM, 10^{-6} M), piuttosto che in uno nanomolare come i CNGK (nM, 10^{-9} M) [Bönigk, 2009].

Parecchi fattori coinvolti nell'induzione della reazione acrosomiale negli spermatozoi di *Arbacia punctulata* sono stati studiati quantitativamente con una tecnica che si avvale di un semplice substrato costituito da un film, sul quale è fissato un gradiente di chemotattico, per monitorare, al microscopio elettronico, l'entità del processo acrosomiale. La verifica della formazione di un tipico processo acrosomiale è stata effettuata su sezioni sottili. Gli spermatozoi vanno incontro alla reazione acrosomiale in acqua di mare artificiale, a valori di pH **>** 9.6, in assenza dello strato gelatinoso (*egg jelly coat*) che ricopre gli oociti, ma a pH 8.6, e in presenza dello strato gelatinoso, un'alta percentuale di spermatozoi va incontro alla reazione acrosomiale. A questo pH, la percentuale di spermatozoi che subisce la reazione acrosomiale è direttamente proporzionale alla concentrazione dello strato gelatinoso. A23187, ionoforo del Ca^{2+}**,** induce la reazione acrosomiale a pH 8.6, in assenza dello strato gelatinoso. Il numero di spermatozoi che presentano la reazione dipende dalla [A23187] e dalla [Ca^{2+}] nel medium. Il pretrattamento degli spermatozoi con basse concentrazioni di ioni La^{3+}**,** antagonisti degli ioni Ca^{2+}, inibisce la reazione acrosomiale indotta dallo strato gelatinoso dell'oocita. Questi risultati suggeriscono che ci siano marcate somiglianze tra la reazione acrosomiale negli spermatozoi di *Arbacia* e i processi secretori dipendenti dalla membrana di fusione in altri tipi cellulari [Decker, 1976].

Speract e resact, polipeptidi degli oociti e loro recettori sulle membrane degli spermatozoi: rispettivi ruoli nella chemotassi

Il principale componente macromolecolare, presente nello strato gelatinoso che riveste l'oocita di *Arbacia punctulata*, è un glicoconiugato di elevata massa molecolare, ricco di residui di fucoso-solfato, che induce la reazione acrosomiale nello spermatozoo. Nello strato gelatinoso degli oociti dei ricci di mare *Strongylocentrotus purpuratus* e *Hemicentrotus pulcherrimus*, sono presenti vari piccoli peptidi: quello meglio caratterizzato è *speract* (*sperm activating peptide H_2*), decapeptide dalla formula: Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly. Sono stati sintetizzati degli analoghi di *speract* e sono stati identificati, in una proteina di massa molecolare di 77 kDa presente sulla superficie degli spermatozoi, specifici recettori che lo riconoscono e legano: questa interazione recettoriale induce un aumento transitorio dei livelli di cGMP (figg. 6A,7) e media l'aumento della motilità e del tasso respiratorio degli

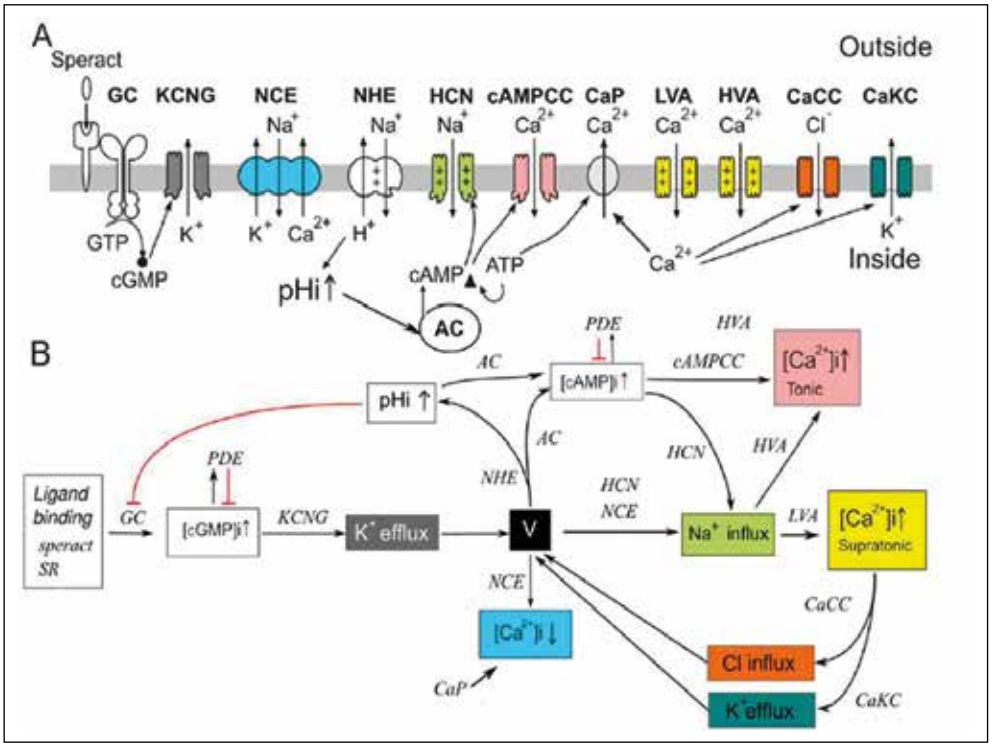


Fig. 6. Pathway di segnalazione inescata da speract negli spermatozoi di riccio di mare:

6A) Principali componenti coinvolti nella pathway di segnalazione di speract: il legame di speract ai suoi recettori presenti sulla membrana del flagello innesca la cascata di eventi che produce cambiamenti nella [Ca^{2+}] in 2 forme diverse, un incremento sostenuto (tonico) e fluttuazioni sovrapposte (sopratoniche).

6B) Eventi prodotti dalla pathway di segnalazione (da: doi:10.1371/journal.pone.0022619.g001)

spermatozoi di *Strongylocentrotus purpuratus* e di un altro riccio di mare, *Lytechinus pictus*, a pH 6.6-6.8. A pH più elevati (7.8-8.0) l'effetto di *speract* è minimo. *Speract* induce anche un aumento transiente dei livelli di cGMP negli spermatozoi (figg. 6A,7) [Ward, 1985]. E' stato usato un analogo peptidico di *speract*, GGG[Y2]-*speract*, per identificare e caratterizzare il recettore di *speract* - una guanilciclasi di 77 kDa della membrana citoplasmatica del flagello degli spermatozoi - su spermatozoi integri e vitali, utilizzando *cross-linking* chimico. A questo scopo, è stato sintetizzato un derivato fluorescente di GGG[Y2]-*speract*, che è stato usato come *probe* nello studio dei recettori degli spermatozoi. Fluoresceina isotiocianato (FITC) è stata coniugata all'amminoacido terminale di GGG[Y2]-*speract*: l'analogo risultante, FITC-GGG[Y2]-*speract*, è stato purificato mediante *size exclusion chromatography* e *reverse phase HPLC*. Studi di competizione di legame, con il peptide fluorescente e spermatozoi intatti e vitali, hanno dato valori di IC_{50} non distinguibili da quelli ottenuti per *speract* nativo e per GGG[Y2]-*speract* (~20 nM). FITC-GGG[Y2]-*speract* ha stimolato la respirazione degli

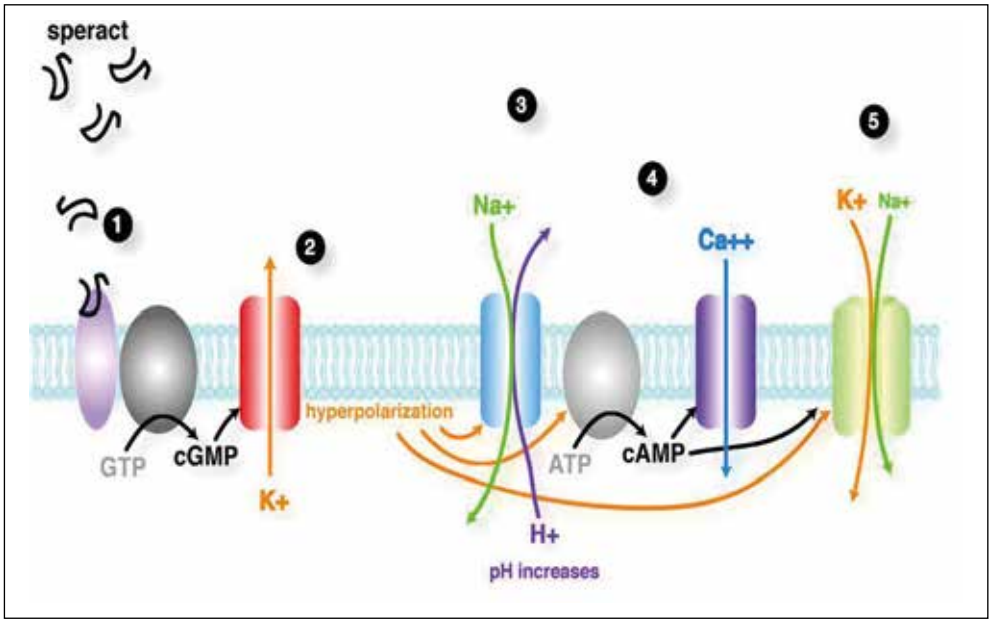


Fig.7. Pathway di segnalazione di speract. L'interazione di speract con i suoi recettori stimola una guanilciclasi (GC) che aumenta cGMP (1). Si apre un canale del K^+ cGMP-dipendente (2), iperpolarizzando la membrana flagellare dello spermatozoo. Questa iperpolarizzazione media l'attivazione delle proteine a valle. Si attiva uno scambiatore Na^+/H^+, con conseguente aumento del pH_i (3). Un'adenil ciclasi è attivata (4), producendo cAMP che stimola l'apertura di un canale del Ca^{2+}. Iperpolarizzazione e cAMP stimolano l'attività del canale SPIH (*superfamiglia dei canali voltage- and cyclic-nucleotide-gated*) (5), che controlla la natura ritmica del battito flagellare (da: Reproduction, 2004 vol. 127: pp. 141-149)

spermatozoi per un valore pari al 50% di quello massimale, ad una concentrazione praticamente identica a quella del peptide nativo (EC_{50} ~ 50 pM, 50 x 10^{-12} M). Facendo ricorso alla *digitally enhanced video imaging fluorescence microscopy*, FITC-GGG[Y2]-*speract* è stato usato per localizzare i recettori di *speract* sui flagelli di spermatozoi integri. Concentrazioni elevate di *speract* non marcato e di GGG[Y2]-*speract* hanno spiazzato l'analogo fluorescente dal recettore di *speract* e questa inibizione è specifica, a differenza di quanto accaduto con peptidi non correlati. Inoltre, esperimenti di legami incrociati, usando ^{125}I-GGG[Y2]-*speract* e teste e flagelli purificati di spermatozoi, hanno prodotto risultati coerenti con i dati ottenuti con il ligando fluorescente su spermatozoi integri e vitali. In conclusione, questi risultati 1) indicano che i recettori di *speract* sono localizzati esclusivamente sui flagelli degli spermatozoi e 2) ne svelano il probabile ruolo nella regolazione della motilità flagellare e, quindi, sull'efficienza della loro attività natatoria [Cardullo, 1994].

Un altro piccolo peptide, *resact*, identificato nel rivestimento gelatinoso degli oociti di *Arbacia punctulata*, stimola 5-10 volte il tasso respiratorio degli spermatozoi di questa specie. Isolato e purificato, ha sequenza amminoacidica: Cys-Val-Thr-Gly-Ala-Pro-Gly-Cys-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Leu-NH_2. *Resact*, ottenuto per sintesi chimica in fase solida e ammidato al car-

bossile terminale Leu, è risultato identico al corrispondente peptide nativo. Sia *resact nativo*, che il suo analogo di sintesi, hanno aumentato la respirazione degli spermatozoi di *Arbacia punctulata* del 50% dei suoi valori massimali, alla concentrazione 0.5 nM e, alla concentrazione 25 nM e pH 6.6, hanno incrementato la [cGMP] del 50% dei suoi valori massimali. L'aumento del consumo di O_2 è risultato associato alla stimolazione della motilità del flagello. Come *speract*, quindi, anche *resact* aumenta i livelli di cGMP, il tasso respiratorio e la motilità degli spermatozoi di *Arbacia punctulata* a pH 6.6, ma a pH 7.8-8.0, i suoi effetti su motilità e respirazione cellulare sono minimi. Infatti, quando il pH extracellulare è elevato (pH 8.0), *resact* non ha stimolato in modo apprezzabile la respirazione, mentre l'aumento di cGMP non si è arrestato. Sia *speract* che *resact* sono specie-specifici: infatti, nessuno dei due polipeptidi induce, a pH 6.6, cambiamenti di motilità e respirazione in spermatozoi eterospecifici. Così, *resact* di *Arbacia punctulata* non cross-reagisce con gli spermatozoi di *Lytechinus pictus* o di *Strongylocentrotus purpuratus* e *speract,* ottenuto dagli oociti di quest'ultimo, attiva gli spermatozoi di *Strongylocentrotus purpuratus,* ma non quelli di *Arbacia punctulata*. Poiché, però, né *speract* né *resact* stimolano respirazione e motilità degli spermatozoi a pH 7.8, che è il pH della normale acqua di mare, la/e loro funzione/i biochimica/che resta/no sconosciuta/e. *Resact* è un potente agente chemotattico per gli spermatozoi di *Arbacia punctulata*: la sua risposta chemotattica, concentrazione-dipendente, è abolita dal pre-trattamento degli spermatozoi con *resact* e mostra un'assoluta dipendenza da una $[Ca^{2+}]$ esterna mM. Quando i recettori sulla superficie degli spermatozoi legano *resact*, si mette in moto una cascata di segnali di trasduzione che coinvolgono il cGMP, innescando un'accelerazione del movimento natatorio degli spermatozoi. Se, durante questa cinetica, si aggiunge *resact* inattivo e, con un flash di luce, se ne induce l'attivazione fotolitica, si verifica un rapido movimento degli spermatozoi verso la sorgente di *resact*. *Resact* induce uno *shift* nella massa molecolare apparente (160-150 kDa) della principale proteina di membrana degli spermatozoi; come succede con gli aumenti di cGMP, questa risposta è evidente a valori di pH extracellulare di 6.6 e 8.0. Questa proteina esiste nelle cellule come fosfoproteina e libera ^{32}P, in coincidenza dei cambiamenti di massa molecolare. *Resact* ~115 nM causa un'apparente conversione della massa molecolare della proteina di 160 kDa, pari al 50% di quella massimale, dopo 1 solo minuto di incubazione. Studi di cinetica indicano che l'apparente conversione della massa molecolare di questa proteina di membrana degli spermatozoi si realizza in soli 5 secondi e che la sua conversione è irreversibile. Il cambiamento di massa molecolare della proteina di membrana è osservabile anche dopo l'aggiunta di monensina A (25 μM) e di NH_4Cl (40 mM), agenti che elevano il pH intracellulare e incrementano i tassi respiratori degli spermatozoi. La proteina recettoriale di membrana si identifica, indubbiamnete, in una guanil-ciclasi, ma poichè le concentrazioni di *resact*, che causano un aumento della conversione della massa molecolare pari al 50% dei valori massimali, sono circa 250 volte maggiori di quelle che inducono un aumento della respirazione pari al 50% dei valori massimali, il rapporto tra la conversione della massa molecolare con il successivo evento fisiologico (aumento dei tassi respiratori) resta da chiarire [Suzuki, 1984].

È stato sintetizzato un analogo di di *resact*, ^{125}I-[Tyr1, Ser8]-*resact*, che si è legato a membrane isolate di spermatozoi. *Resact*, ma non *speract*, è entrato in competizione con questo radioligando per il legame al recettore di membrana di *resact*. Quando le membrane sono state preparate in condizioni appropriate, la massa molecolare della guanil-ciclasi è rimasta a 160 kDa; l'incubazione delle membrane con ^{32}P-ATP ha portato alla formazione di ^{32}P-guanil-ciclasi; l'aggiunta di *resact* non marcato all'incubato ha provocato lo *shift* della massa molecolare della guanil-ciclasi, ha causato la perdita completa del ^{32}P e una riduzione pari al 70% dell'attività guanil-ciclasica nel volgere di 1 minuto; l'ED_{50} di *resact* è risultata 100 nM. *Speract* non ha causato nessuno di questi effetti. Questa è la prima dimostrazione di ri-

sposte mediate da recettori di membrane isolati di spermatozoi, identiche a quelle viste nelle cellule intatte [Bentley, 1985].

Si pensa che i peptidi presenti nello strato ialino gelatinoso extracellulare, degli oociti di ricci di mare, possano giocare un ruolo importante nel processo di fertilizzazione, anche se una valutazione separata degli effetti della chemoattrazione, della chemocinesi, dell'agglomerazione degli spermatozoi e di altri possibili ruoli dello strato gelatinoso non sono stati ancora chiariti. E' stato ipotizzato che specifici peptidi, presenti nello strato extracellulare, o rivestimento gelatinoso, degli oociti dei ricci di mare giochino un ruolo determinante nella fertilizzazione, sebbene non sia stata riportata una valutazione separata degli effetti della chemoattrazione, della chemocinesi, dell'agglomerazione degli spermatozoi e degli altri possibili ruoli del rivestimento gelatinoso. Per superare questo gap, è stato usato un dispositivo fluidico che rende possibile determinare le differenze nei coefficienti di diffusione degli spermatozoi di *Arbacia punctulata* posti in presenza di due chemoattraenti: lo strato gelatinoso e *resact*. Duplice lo scopo della ricerca: 1) determinare e confrontare, sperimentalmente, i coefficienti di diffusione degli spermatozoi di questo riccio, posti in acqua marina, in soluzioni di strato gelatinoso e in soluzioni di *resact* e 2) determinare l'effetto del coefficiente di diffusione degli spermatozoi di *Arbacia punctulata* e delle dimensioni dei suoi oociti, sulla frequenza delle collisioni tra spermatozoi e oociti, usando simulazioni stocastiche, che tracciano, cioè, l'evoluzione di variabili che possono cambiare a caso. Per quantificare l'effetto chemotattico, sono stati usati valori numerici dei coefficienti di diffusione, ottenuti diffondendo spermatozoi in acqua di mare, in soluzioni di *resact* o di rivestimento gelatinoso. Ciò ha reso possibile l'incorporazione diretta di ingrandimenti noti dell'oocita e coefficienti alterati di diffusione degli spermatozoi in presenza di un chemoattraente, nelle simulazioni stocastiche. I risultati delle simulazioni hanno dimostrato che il tipo di spermatozoo, il diametro degli oociti e il coefficiente di diffusione sono fattori significativi nel processo di fertilizzazione degli oociti, perché aumentano la frequenza di collisioni. Il ruolo principale dello strato gelatinoso è chiaramente quello di aumentare la motilità degli spermatozoi (Inamdar, 2007).

Conclusioni

I ricci di mare, e *Arbacia punctulata* in particolare, occupano da un secolo un ruolo centrale nell'esplorazione di alcuni degli aspetti e dei meccanismi che sono alla base dei modelli animali più usati nelle ricerche sulla fisiologia della fertilizzazione e della chemotassi e delle prime fasi dello sviluppo embrionale. Queste e molte altre ricerche sul modello animale *Arbacia punctulata* e su altri echinodermi marini hanno giocato un ruolo chiave come modelli animali per lo studio della fisiologia della fertilizzazione e della chemotassi. Tuttora, col progresso della biologia molecolare, *Arbacia punctulata* offre modelli di indagine usati in diversi campi delle bioscienze, sia di base che applicate.

Note

Nota 1. La degradazione di Edman è un metodo che permette di sequenziare gli amminoacidi presenti all'interno dei peptidi. Questa metodica consente di tagliare un solo residuo, quello N-terminale, il quale con l'isotiocianato di fenile (PITC) va a formare una feniltioidantoina facilmente identificabile con semplici tecniche analitiche.

Nota 2. Il dominio WAP o *four-disulfide core* (4-DSC) comprende 8 residui di cisteina coinvolti in legami -S-S- in arrangiamento conservato.

Nota 3. Dallo strato gelatinoso dell'oocita di *Asterias amurensis* (foto 2, stella marina) sono stati isolati 12 *sperm-activating peptides*, chiamati collettivamente *asterosaps* (SAP). Undici SAP sono stati identificati strutturalmente per mezzo dell'analisi della sequenza amminoacidica e mediante spettrometria di massa con ionizzazione electro-spray. Sono tutti tetratriacontapeptidi, ricchi di glutamina, con un legame -S-S- tra Cis8 e Cis32. Questi SAP sono più grandi di quelli dei ricci di mare e non mostrano nessuna similitudine di sequenza con proteine note. Le regioni amminoterminali, dove si osservano le differenze strutturali, non sono importanti per l'attività, mentre il legame -S-S- lo è.

Nota 4. Quando uno spermatozoo entra in contatto con un oocita, un polisaccaride solforato, presente nell'involucro gelatinoso dell'uovo, si lega a un recettore della sua membrana plasmatica. Il legame determina l'apertura di canali del calcio presenti sulla membrana dello spermatozoo e quindi l'aumento degli ioni calcio al suo interno, che inducono la reazione acrosomiale: fusione dell'acrosoma con la membrana plasmatica dello spermatozoo e emissione di enzimi idrolitici (fosfatasi acida, molte proteasi e ialuronidasi) per i rivestimenti esterni dell'uovo, rendendo possibile il passaggio dello spermatozoo attraverso i rivestimenti dell'uovo durante la fecondazione. L'acrosoma è un organello presente nella parte anteriore dello spermatozoo, che deriva dalla fusione di vescicole provenienti dal complesso del Golgi e contiene gli enzimi idrolitici di cui si è detto (fig. 2).

Nota 5. La spettrometria di massa è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi in tracce di sostanze note. Viene comunemente usata in combinazione con tecniche separative, quali la gascromatografia e la cromatografia in fase liquida (HPLC) o, più recentemente, con tecniche quali il plasma a induzione. Lo spettrometro di massa trasforma le molecole della sostanza in esame in ioni e li separa in fase gassosa in base al loro rapporto massa/carica (m/z). In spettrometria di massa l'*elettrospray*, o elettronebulizzazione, è una tecnica di ionizzazione evaporativa e un'interfaccia per la cromatografia liquida.

Nota 6. Fluo-4 è un permeante cellulare, analogo di Fluo-3 (usato per rappresentare la dinamica spaziale della segnalazione del Ca), nel quale i 2 atomi di cloro sono sostituiti da 2 atomi di fluoro. Questa sostituzione aumenta l'eccitazione della fluorescenza a 488 nm, innalzando i livelli dell'emissione di fluorescenza dei segnali. Fluo-4AM è l'acetometilestere, non fluorescente, di Fluo-4: entrato nella cellula, Fluo-4AM viene clivato generando Fluo-4 libero e fluorescente.

Nota 7. In cellule non eccitabili elettricamente, l'influsso di Ca^{2+} è essenziale per la regolazione di una serie di processi, distinti cineticamente, che coinvolgono esocitosi, controllo enzimatico, regolazione genica, crescita e proliferazione cellulare e apoptosi. La *pathway* principale dell'entrata di Ca^{2+} in queste cellule è quella gestita dai depositi di Ca^{2+}: lo svuotamento del deposito di Ca^{2+} intracellulare attiva l'entrata dell'afflusso di Ca^{2+} (*store-operated* Ca^{2+}, SOC) o afflusso capacitivo di Ca^{2+}.

Nota 8. KB-R7943 (2-[2-[4-(4-nitrobenzilossi)fenil]etil]isotiourea metansulfonato) è un inibitore dello scambiatore inverso Na^{+}/Ca^{2+} (NCX(rev)), determinante nello stabilire il ruolo di NCX(rev) nella *deregulation* del Ca^{2+} indotta dal glutammato nei neuroni. Il *reverse mode sodium calcium exchange* (NCX(rev)), facilitato dalla co-localizzazione dello scambiatore con i canali TRPC (*transient receptor potential cation channels*), contribuisce all'afflusso di Ca^{2+} e alla ricarica di Ca^{2+} nel reticolo endoplasmico.

Note 9 e 11. I canali ionici CNG (*cyclic nucleotide-gated*) e CNGK (*K^{+}-selective cyclic necleotide-gated*) funzionano in risposta al legame di un nucleotide ciclico (cGMP, cAMP). I CNG sono canali cationici non selettivi presenti nelle membrane di vari tipi cellulari e sono importanti nella trasduzione sensoriale e nello sviluppo cellulare. I canali CNGK sono selettivi per il potassio.

Nota 10. *Caged cGMP* è un derivato fotolabile di cGMP, permeabile alle membrane, biologicamente inattivo, che può essere caricato nelle cellule e poi irradiato con impulsi di luce a 360 nm, per causare sbalzi di concentrazione di cGMP

Bibliografia

- Bentley, J. K., Shimomura, H., Gabers, D. L., 1986; Retention of a functional resactreceptor in isolated sperm plasma membranes. Cell, vol. 45: pp. 281-288
- Böhmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto,M., Hoshi, M., Hildebrand, R.,[1] and Kaupp, U. B., 2005; Ca^{2+} spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. EMBO J., vol. 24: 2741-2752

- Bönigk, W., Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T., and Kaupp, U. B., 2009; An Atypical CNG Channel Activated by a Single cGMP Molecule Control Sperm Chemotaxis. *Sci. Signal*. vol. 2: pp. ra68
- Cardullo, R. A., Herrick, S. B., Peterson, M. J., Dangott L. G., 1994; Speract receptors localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. Dev. Biol., vol. 162: pp. 600-607
- Decker, G. L., Joseph, D. B., Lennarz, W. J., 1976; A study of factors involved in induction of the acrosomal reaction in sperm of the sea urchin *Arbacia punctulata*. Developmental Biology, vol. 53: pp. 115-125
- Inamdar, M.V., Kim, T., Chung, Y. K., Was, A. M., Xiang, X., Wang, C. W., Takayama, S., Lastoskie, C. M., Thomas, F. I., Sastry, A. M., 2007; Assessment of sperm chemokinesis with exposure to jelly coats of sea urchin eggs and resact: a microfluidic experiment and numerical study. *J. Exp. Biol., v*ol. 210 (Pt 21): pp. 3805-3820
- Nemer, M., 1963; Old and new RNA in the embryogenesis of the purple sea urchin. Proc Natl Acad Sci U S A., vol. 50: pp. 230-235
- Noll, H., Matranga, M., Cervello, M., Humphreys, T., Kuvasaki, B., and Adelson, D., 1985; Characterization of toposomes from sea urchin blastula cells: A cell organelles mediating cell adhesion and expressing positional information. Pro. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 82: pp.8063-8066
- Noll, H., Alcedo, J., Daube, M., Frei, E., Schiltz, E., Hunt,J., Humphries, T., Matranga, V., Hochstrasser, M., Aebersold, R., Lee, H., Noll, M., 2007; The toposome, essential for sea urchin cell adhesion and development, is a modified iron-less calcium-binding transferrine. Dev. Biol., vol. 310: 54-70
- Strunker, T., Weyand, I., Bönigk, W., Van Q, Loogen, A., Brown, J. E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E,, Kaupp, U. B.,. 2006; A K^+-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. Nat. Cell Biol., vol. 8: 1149-1154
- Suzuchi, N., Shimomura, H,, Radany, E. W., Ramarao, C. S., Ward, G. E., Bentley, J. K., Garbers, D. L. , 1984; A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. J. Biol. Chem., vol. 259: pp. 14874-14789
- Ward, G. E., Brokaw, C.J., Garbers, D. L., Vacquier, V. D., 1985; Chemotaxis of Arbacia punctulata Spermatozoa to Resact, a Peptide from the Egg Jelly Layer. The J. Cell Biol, vol. 101: pp.2374-2379

APLYSIA CALIFORNICA, MODELLO ANIMALE PER RICERCHE DI NEUROBIOLOGIA, DELLE BASI MOLECOLARI DELL'APPRENDIMENTO E DELLA MEMORIA

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi; Università degli Studi di Torino

Biologia di *Aplysia californica*

Il genere *Aplysia* comprende specie di molluschi appartenenti a un unico *clade*, con un unico, comune antenato ancestrale. Sono gasteropodi opistobranchi (hanno branchie posteriori), di dimensioni medio grandi-grandi, con un soffice, sottile e trasparente guscio proteico interno, visibile attraverso il mantello, comunemente chiamati *sea slugs* (lumaconi marini). Il genere deriva il nome dal greco (α privativo e πλύω, lavo, per la gran quantità di muco che emettono quando sono presi in mano). Alcune specie del genere *Aplysia* vivono nel Mediterraneo: *A. depilans*, *A. fasciata* (bue marino) e *A. punctata*.

Aplyisia californica (Famiglia: *Aplysiidae*, Genere: *Aplysia*) (fig. 1) popola le coste della California e della Baia California, ma la si può trovare anche sui bassi fondali, al largo della Florida. Abita zone tidali e subtidali di acque subtropicali (18-20 metri di profondità) eufotiche, dove arriva luce solare sufficiente da permettere la fotosintesi. Qui si nutre di alghe bentoniche, usando un paio di mandibole e una radula rasposa retrattile, simile a un nastro chitinoso, ricoperto da varie file di dentelli duri e ricurvi, che poggia su una base cartilaginea. *Aplysia* ha un sistema digestivo sviluppato: di fronte allo stomaco ha un canale alimentare che termina in una specie di gozzo, foderato da placche cornee, che assicura una masticazione completa del cibo prima della digestione (Borradaile, 1963; Meinkoth, 1981).

Gli individui adulti popolano habitat riparati, in acque poco profonde, caratterizzate da basse maree, mentre quelli giovani vivono in acque più profonde, dove sono nati (Borradaile, 1963). *Aplysia californica* ha due paia di antenne sulla testa: quelle anteriori, vicine alla bocca, sono più grandi, simili a orecchie (di qui i nomi volgari *"sea hare"*, "lepre di mare", ma anche "asino di mare"), mentre l'altra coppia di antenne, in mezzo agli occhi, porta due rinofori che sono organi olfattori con funzioni tattili e chemosensoriali. Il mantello copre le branchie e ha estensioni esterne simili ad ali (parapodi), organi deputati al nuoto, che estendono la lunghezza del corpo dell'animale verso l'alto, oltre i due lati della schiena, per riunirsi sul dorso (Laboratory Animal Europe, 2013). Per muoversi sul fondo marino, *Aplysia* usa il robusto piede ventrale, che si estende per tutto il corpo. La pigmentazione della cute varia dal rossiccio al brunastro al verdastro, con spot circolari o lineari, bianchi o scu-

Fig. 1. Aplysia californica (da: slideplayer.it)

ri, e dipende dal colore delle alghe delle quali si nutre. Grazie alle sue dimensioni corporee (20÷40 fino a 75 cm di lunghezza, 20 cm di larghezza e altezza, 1÷7 kg di peso) è il più grosso gasteropode vivente (Laboratory Animal Europe, 2013). È ermafrodita: dotato di una singola apertura e dotto per sperma e uova, e si riproduce per via sessuata. A primavera si dirige verso acque più profonde, a circa 17°C, e forma lunghe catene di una ventina di individui, che hanno funzione sia di maschio che di femmina, e depone uova che, fecondate, sono raccolte in sacchetti rosa gelatinosi, avvolti attorno ad alghe o pietre (Borradaile, 1963: Meinkoth, 1981). Lo sviluppo di *Aplysia* dura 19 settimane e attraversa 4 fasi: fase planctonica (dalla schiusa delle uova al 34° giorno), fase metamorfica (35°-37° giorno), fase giovanile (45°-80° giorno) e maturità sessuale (dall'85° giorno; 133 giorni dalla deposizione delle uova). Grazie alle tossine che ha in corpo, sono pochi i predatori che osano minacciarla: tra questi, c'è l'anemone verde gigante (*Anthopleura xanthogrammica*) che ne fa strage, ma vomita quel che resta di *Aplysia* quando la digestione arriva a una ghiandola digestiva ricca di sostanze tossiche e ripugnanti. Altri predatori sono il pesce stella, le aragoste, gli astici e l'opistobranchio *Navanax inermis*, che preferisce nutrirsi delle *Aplysie* più giovani.

Aplysia californica, modello animale in ricerche di neurobiologia

Aplysia californica è modello animale di elezione per lo studio dei processi biologici sinaptici, dell'apprendimento e della memoria. Il neurologo Eric Kandel (1929, Nobel 2000), studioso della neurobiologia dell'apprendimento e della memoria, era alla ricerca di un modello animale nel quale fosse possibile modificare un singolo comportamento semplice, controllato da un piccolo numero di cellule nervose, grandi, identificabili e accessibili, in modo tale da poterlo mettere in relazione con eventi verificatisi esclusivamente nelle cellule preposte a quel dato comportamento (Meinkoth, 1981). Dopo un'ampia ricerca della specie più adatta ai suoi studi, Kandel scelse le specie del genere *Aplysia*, perchè questi molluschi offrono vari vantaggi rispetto ad altre specie: hanno un sistema nervoso relativamente semplice, di circa 20.000 neuroni che, insolitamente grandi (diametro del pirenoforo circa 1 mm) tanto da permettere di effettuare registrazioni intracellulari, sono facilmente accessibili, identificabili e inviano segnali elettrici simili a quelli prodotti dai neuroni umani. Eric Kandel, studiando in *Aplysia* apprendimento e memoria, dimostrò che questi processi producono variazioni biochimiche che stimolano l'efficacia della trasmissione sinaptica.

Nonostante l'apparente semplicità del suo sistema nervoso (fig. 2), *Aplysia californica* è capace di una varietà di comportamenti di apprendimento associativi e non, di sensibilizzazione, di assuefazione e di condizionamento attivo e passivo. Questo mollusco esibisce un comportamento riflesso difensivo di ritrazione delle branchie e del sifone (*gill and siphon withdrawal reflex* - GSWR) (fig. 3), in risposta a stimoli tattici deboli/moderati portati sulle branchie e sul sifone. Il GSWR è mediato da sinapsi elettriche con parecchi neuroni, capaci di un *firing* contempoaneo e sincronizzato, che assicurano risposte rapide, in presenza di un pericolo. Se la stimolazione tattile viene ripetuta, il GSWR va incontro a diminuita reattività: è il fenomeno dell'assuefazione[1] (ASS), forma di apprendimento in cui un organismo modula la risposta a uno stimolo presentato ripetutamente (Pinsker, 1970; Kupfermann, 1970; Castellucci, 1970). Kandel *et al*. scoprirono che questo riflesso comportamentale e involontario di *Aplysia*, mediato da motoneuroni identificati situati nel ganglio addominale, è dotato di una sua plasticità: se è ripetutamente evocato da stimoli tattici portati sui bordi del mantello e sul sifone, l'ampiezza della risposta va incontro a una marcata riduzione ma, dopo un periodo di riposo, mostra un forte recupero. L'ampiezza di una risposta assuefatta è facilitata (aumentata) dalla presentazione di un forte stimolo tattile, portato in un'altra parte del corpo dell'animale (disassuefazione[2], DISASS) (fig. 3).

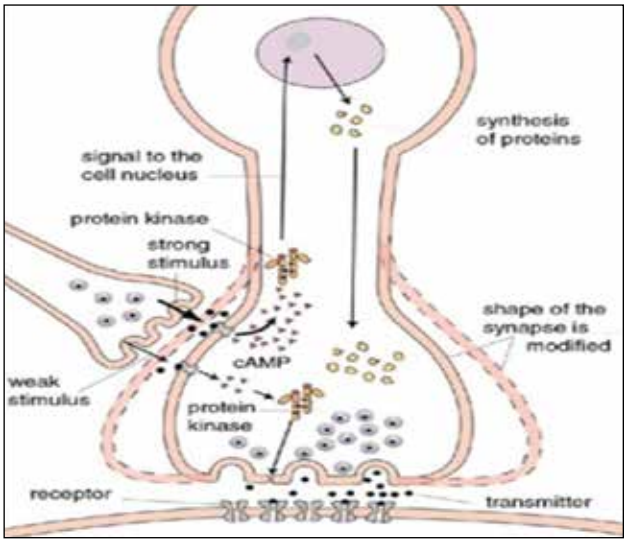


Fig. 2. Sistema nervoso di *Aplysia californica*. (A): Vista dorsale con parapodi rimossi per esporre il mantello, il sifone e le branchie. (B) I 4 gangli principali formano un anello attorno all'esofago, mentre il ganglio addominale è vicino al sistema digestivo (da: Kandel E., 1976, Cellular bases of behavior, W.H. Freeman & Company, San Francisco, USA)

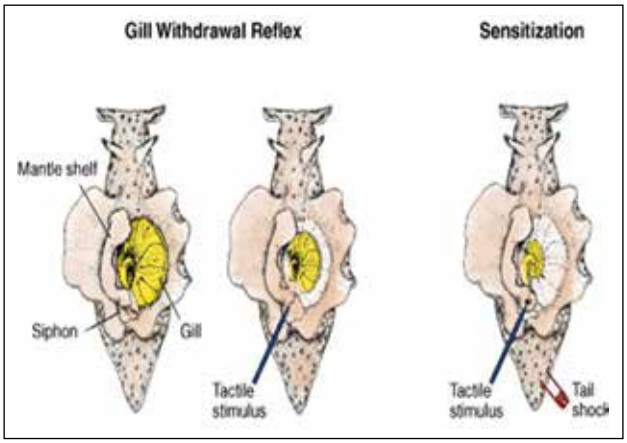


Fig. 3. Gill withdrawal reflex e sensitization (da: Kandel, 2001)

Molte caratteristiche di ASS e DISASS del comportamento di *Aplysia* sono simili a quelle riscontrabili nei vertebrati (Pinsker, 1970). Durante lo studio dei correlati neurali di ASS e DISASS del GSWR, su una preparazione semi-intatta di *Aplysia*, sono state effettuate registrazioni simultanee intracellulari, in motoneuroni identificati delle branchie, situati nel ganglio addominale, e comportamentali delle branchie stesse. Si è potuto così dimostrare che ASS e DISASS non sono dovute a cambiamenti periferici nei recettori sensoriali della muscolatura delle branchie, ma sono causati da cambiamenti nell'ampiezza dei potenziali sinaptici eccitatori, prodotti a livello dei motoneuroni delle branchie (Kupfermann, 1970). Kandel *et al*., studiando i meccanismi di ASS e DISASS in un ganglio addominale isolato connesso a un frammento di pelle prelevato dalla superficie tattile ricettiva del GSWR, hanno ottenuto registrazioni intracellulari simultanee dai neuroni sensitivi e da un motoneurone identificato tra quelli principali, riuscendo a ridurre il riflesso alle sue componenti monosinaptiche; i potenziali monosinaptici eccitatori postsinaptici mostrano una profonda depressione di bassa frequenza, dopo stimolazione ripetuta, e una facilitazione eterosi-

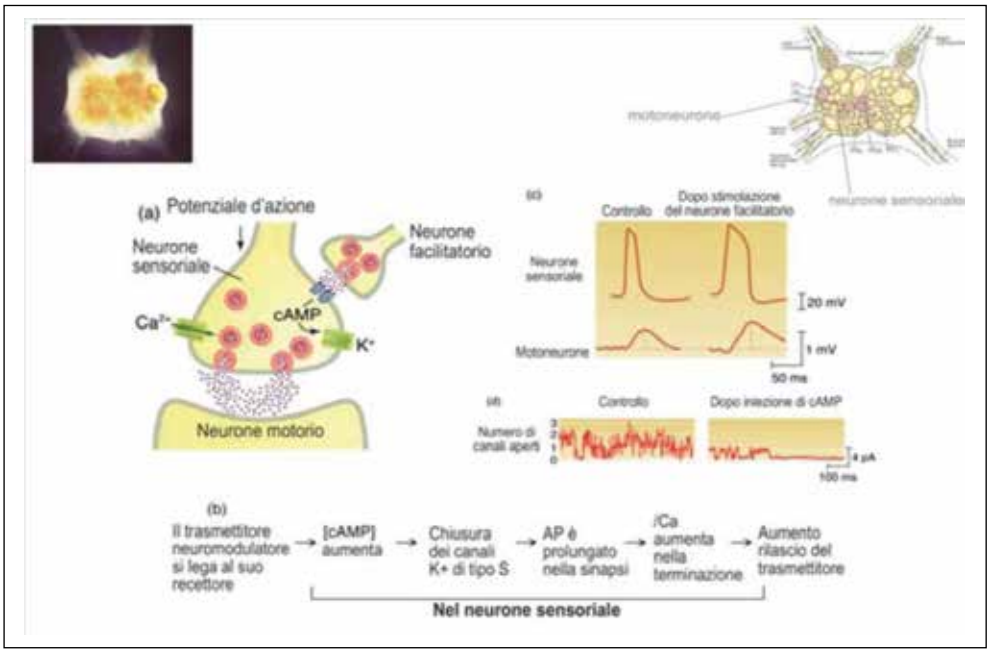


Fig. 4. Facilitazione eterosinaptica (da: Barone D, Guarda F., Summa, n° 5/2014, pp: 51- 58)

naptica[4] (fig. 4), dopo applicazione di un forte stimolo a un'altro *pathway*. Così, sia ASS sia DISASS possono essere spiegate, in parte o forse *in toto*, da cambiamenti nell'efficacia di specifiche sinapsi eccitatorie (Castellucci, 1970). Con un'analisi combinata comportamentale e di neurofisiologia cellulare, è stato possibile esaminare il rapporto tra sensibilizzazione[3] (SENS) e DISASS del GSWR (fig. 3) (Shimahara, 1975).

Il riflesso di ritrazione delle branchie allo stimolo tattile del sifone o della ghiandola della porpora, sul bordo del mantello, mostra ASS, DISASS e SENS. La ghiandola della porpora e il sifone presentano *pathway* afferenti indipendenti, ognuna capace di suscitare il GSWR. L'ASS di una *pathway* non influisce sull'altra, ma un comune stimolo "disassuefatorio" produce DISASS della *pathway* assuefatta e SENS della *pathway* non assuefatta. Questi risultati rafforzano l'idea che la DISASS non sia dovuta alla rimozione dell'ASS, ma sia piuttosto una facilitazione indipendente, sovrapposta all'ASS. A livello cellulare, i correlati neurali di SENS e DISASS sono differenti riflessi di un comune processo facilitatorio eterosinaptico, che coinvolgono un'aumentata efficacia della trasmissione sinaptica eccitatoria a livello della sinapsi tra neuroni motori e neuroni sensoriali (Shimahara, 1975).

Basi molecolari di apprendimento e memoria in *Aplysia californica*

La facilitazione eterosinaptica tra un interneurone in studio e un neurone postsinaptico, prodotta dalla stimolazione di una *pathway* separata, è stata studiata nel ganglio pleurale sinistro (Walsh, 1984) (fig. 4). L'esperimento, *in vitro*, è consistito nel registrare gli effetti di un breve tetano, applicato a nervi tentacolari e tegumentali, sull'ampiezza di potenziali monosinaptici e postsinaptici unitari registrati nella cellula gigante sinistra e generati stimolando,

ogni 10 sec., l'interneurone in studio, il cui potenziale di membrana veniva registrato in parallelo. L'iniezione iontoforetica di 5-HT (serotonina) in siti critici (presumibilmente sinaptici) del neuropilo (zona tra i pirenofori) evoca una facilitazione del potenziale post-sinaptico in studio (fig. 5), simile alla facilitazione eterosinaptica. Sia questa sia quella indotta da 5-HT sono soppresse dalla presenza, nel bagno di coltura, di 5-HT 10^{-5} M o di LSD-25 $3x10^{-4}$ M. L'azione della 5-HT iniettata, sulla conduttanza della membrana della cellula gigante sinistra, è depressa anche in presenza di 5-HT nel bagno, ma non da $3x10^{-4}$ M LSD-25. Dal parallelismo delle proprietà della facilitazione eterosinaptica e di quella indotta da 5-HT, si può supporre che 5-HT sia il neuromediatore della facilitazione eterosinaptica (fig. 4). Pare anche probabile che 5-HT sia rilasciata dalla *pathway* eterosinaptica a livello della terminazione sinaptica dell'interneurone oggetto del test sulla cellula gigante e che aumenti l'efficacia di questa sinapsi, agendo probabilmente sulla quantità di trasmettitore rilasciato nella chiave sinaptica (Walsh, 1984) (fig. 4).

La facilitazione delle connessioni sinaptiche tra i neuroni sensoriali e i motoneuroni che mediano il riflesso caudale di *withdrawal* in *Aplysia*, è prodotta da stimoli sensibilizzanti, mimati dalla perfusione con 5-HT dei gangli pleurali e pedali di una preparazione semi-intatta di *Aplysia*. Oltre alla facilitazione sinaptica, 5-HT produce una depolarizzazione associata a un'aumentata resistenza all'input nei neuroni sensoriali. I cambiamenti indotti da 5-HT sono mediati da un aumento dei livelli di cAMP. Un potente attivatore della adenilciclasi, la forscolina, mima la risposta di 5-HT, ma blocca gli effetti di successive applicazioni di 5-HT, indicando che forscolina e 5-HT agiscono attraverso un meccanismo d'azione in comune e

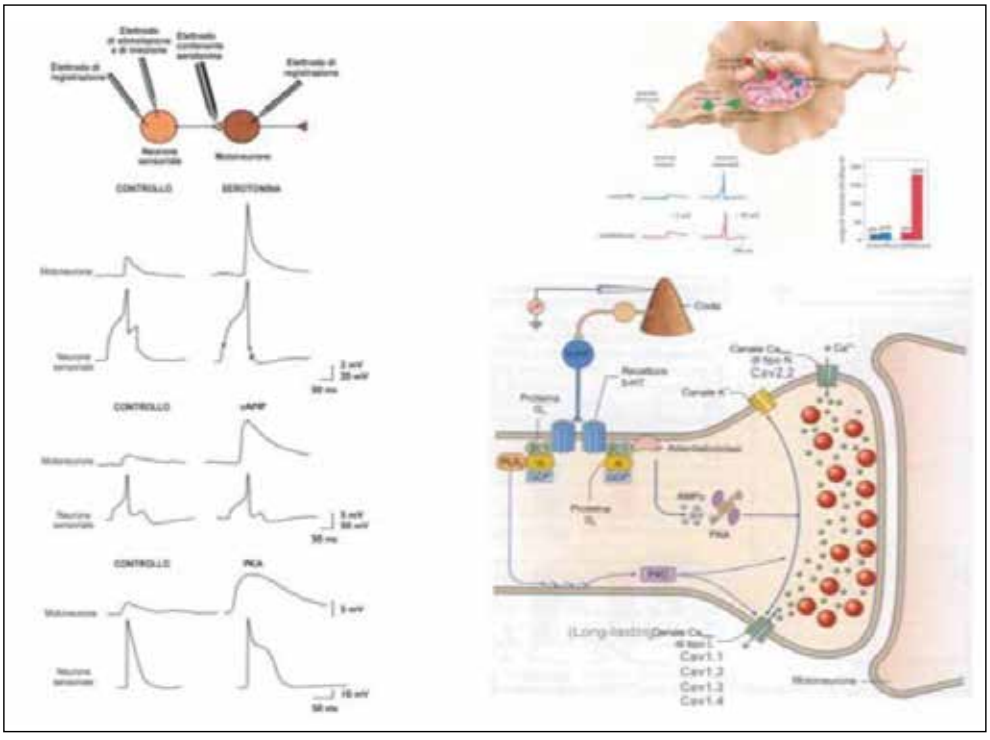


Fig. 5. Facilitazione del potenziale post-sinaptico (da: Barone D, Guarda F., Summa, n° 5/2014, pp: 51- 58)

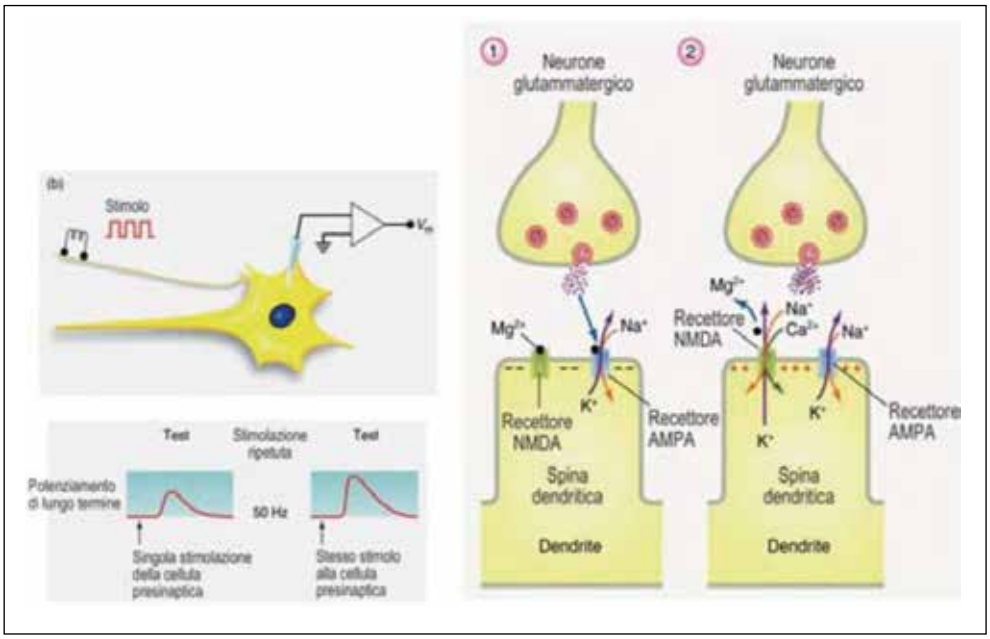


Fig. 6. Potenziamento di lungo termine (da: Barone D, Guarda F., Summa, n° 5/2014, pp: 51- 58)

saturabile. Con la tecnica del *voltage clamp* (blocco di voltaggio) e la sostituzione di ioni, si è dimostrato che la risposta a 5-HT è dovuta, almeno in parte, a una riduzione della conduttanza di ioni K+ a riposo (Glanzman, 2009).

Si è già osservato che *Aplysia* risponde con il GSWR a uno stimolo cutaneo tattile debole/moderato e che, se questo è ripetuto, il GSWR va incontro ad ASS. Sono state riscontrate ASS di breve (<30 minuti) e di lungo termine (≥24 ore). L'ASS del GSWR correla con, ed è in parte dovuta alla, depressione della trasmissione a livello della connessione monosinaptica tra neuroni sensoriali meccanorecettivi e motoneuroni nel ganglio addominale. La depressione di breve termine della sinapsi sensoriale-motoria, correlata all'ASS, è chiaramente ascrivibile solo a cambiamenti presinaptici. Tuttavia, cambiamenti all'interno del neurone sensoriale, di per sé, non sono responsabili di una depressione più persistente della sinapsi sensoriale-motoria. Si è anche ipotizzato che l'ASS di lungo termine in *Aplysia* coinvolga processi postsinaptici e, più precisamente, l'attivazione di recettori ionotropici glutammatergici postsinaptici AMPA e NMDA, nonché l'attività fosfatasica di proteine - fosfatasi 1, 2A e 2B (calcineurina (CaN), serina/treonina fosfatasi) incluse - e il coinvolgimento di canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (fig. 6).

I recettori AMPA sono importanti per la trasmissione sinaptica eccitatoria rapida nel SNC; localizzati al centro della membrana postsinaptica, generano un potenziale post-sinaptico eccitatorio molto rapido, ma debole (fig. 6). Ricerche su cellule isolate in coltura hanno dimostrato una depressione omosinaptica di lungo termine (LTD) della sinapsi sensoriale-motoria e una LTD della risposta al glutammato di motoneuroni isolati in coltura (LTD emisinaptica). La LTD è un fenomeno di plasticità sinaptica, ovvero è la possibilità dei neuroni di modificare la loro capacità di comunicare tra loro, e consiste nella diminuzione dell'efficacia di una sinapsi

in seguito a un particolare tipo di stimolazione o di attività endogena; è definita omosinaptica se, durante l'induzione, i terminali pre- e post-sinaptici sono attivati contemporaneamente. Queste forme *in vitro* di LTD trovano paralleli meccanicistici nell'ASS di lungo termine *in vivo*. In particolare, la LTD omosinaptica della sinapsi sensoriale-motoria necessita di elevati livelli di Ca^{2+} intracellulare all'interno del motoneurone, mentre la LTD emisinaptica richiede l'attività dei recettori AMPA ed NMDA (fig. 6). Inoltre, l'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato di tipo I e II (mGlu1- 2) può indurre una LTD emisinaptica (Carew, 1971). A differenza dei recettori AMPA e NMDA, responsabili della trasmissione sinaptica eccitatoria, i recettori mGlu1-2 fungono da modulatori della sinapsi glutammatergica, essendo reclutati solo in condizioni di elevate concentrazioni extracellulari di neurotrasmettitore (fig. 6).

Correlati comportamentali di apprendimento e memoria

Abbiamo visto che la SENS è una generica facilitazione, prodotta da uno stimolo forte e/o nocivo, che incrementa una risposta successiva, mentre si pensa che la DISASS rappresenti uno speciale tipo di SENS, nel quale la facilitazione è sovrapposta a un livello di risposta assuefatta. A lungo, SENS e DISASS sono state considerate facce di un stesso processo. L'ipotesi del processo unitario si basava sull'osservazione che sia le risposte diminuite (assuefatte), che quelle non diminuite, sono facilitate (potenziate) da un comune stimolo forte e/o nocivo. Tuttavia, quest'osservazione non esclude la possibilità che SENS e DISASS siano processi separati, attivati in parallelo da uno stimolo forte. Studi in vitro su neuroni sensoriali del GSWR sembrano avallare quest'ipotesi. Se fossero un processo unitario, dovrebbero emergere ontogeneticamente allo stesso tempo; se, invece, fossero due processi diversi, potrebbero emergere in base a orari ontogeneticamente diversi.

Per chiarire questo punto, è stata analizzata l'evoluzione dell'apprendimento sull'insorgenza temporale dei due fenomeni nel GSWR in giovani *Aplysie* in 3 stadi di sviluppo, parte sottoposte a un training di DISASS, parte a un training di SENS, consistenti nell'osservazione degli effetti di un forte shock caudale su risposte, rispettivamente, assuefatte e non diminuite. La DISASS è presente nelle giovani *Aplysie* nei tre stadi giovanili considerati, mentre la SENS compare solo alcune settimane più tardi, a un'età ancora giovanile, ma più avanzata, dimostrando che i due fenomeni hanno differenti orari ontogenetici (Rankin, 1988).

Le ricerche sulle basi biochimiche della memoria di *Aplysia* sono in continua evoluzione. Si pensa che l'induzione della plasticità sinaptica e della memoria (fig. 7) dipenda dal'equilibrio tra fattori molecolari opposti, quali le chinasi e le fosfatasi di proteine. L'inibizione di CaN potenzia l'induzione della memoria di medio-termine (ITM) e quella di lungo termine (LTM) per la SENS indotta da uno shock caudale, ma non ha effetto sulla memoria di breve termine (STM). Per identificare la cascata molecolare alla base del miglioramento della memoria dovuto alla inibizione di CaN, è stato esaminato il ruolo di MAPK(ERK1/2) (*extracellular signal-regulated kinase 1/2/mitogen-activated protein kinase*). Esperimenti a livello molecolare dimostrano che un impulso di 5-HT, che di per sé non attiva MAPK, induce una significativa attivazione di MAPK nei neuroni sensoriali del ganglio pleurale, quando CaN è inibita. Esperimenti comportamentali confermano che l'induzione potenziata di ITM ed LTM, prodotta dall'inibizione di CaN, dipende dall'attività di MAPK. Questi risultati dimostrano che CaN agisce da vincolo inibitorio nella formazione di fasi di lunga durata della memoria e che l'induzione potenziata di ITM e LTM, da parte dell'inibizione di CaN, richiede l'attività di MAPK (Sharma, 2003).

Un ampio *range* di cascate di segnali molecolari nei neuroni è coinvolto nei processi della memoria, ma la loro integrazione spaziale e temporale non è del tutto chiarita. Per approfondire questi aspetti, sono stati studiati, simultaneamente, il *timing* e la localizzazione

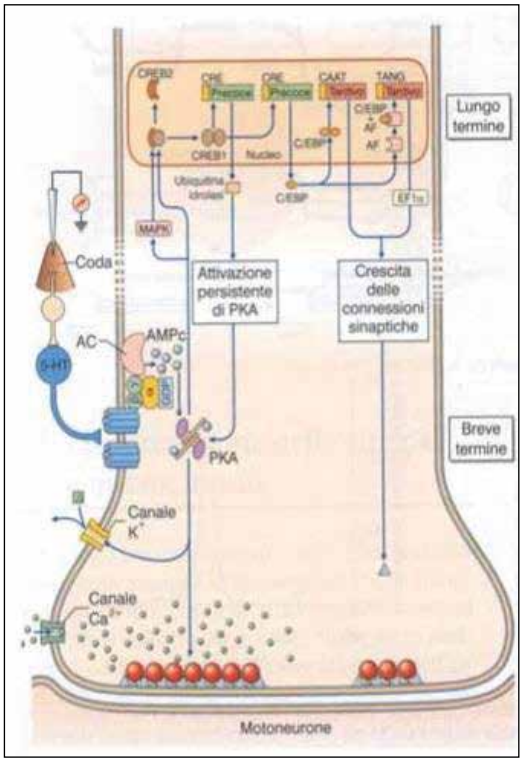


Fig. 7. Plasticità sinaptica alla base della formazione della memoria a breve e lungo termine: integrazione spazio-temporale delle cascate di segnali di MAPK(ERK1/2) e PKA (da: Barone D, Guarda F., Summa, n° 5/2014, pp: 51- 58)

subcellulare di due segnali molecolari, MAPK(ERK1/2) e proteina chinasi A (PKA), ambedue fattori critici nella formazione di una durevole memoria per la SENS. Inoltre se ne è esplorata l'interazione durante la formazione di una durevole facilitazione sinaptica, correlato cellulare della memoria, a livello delle sinapsi sensoriali-motorie della coda di *Aplysia*. Le due cascate di segnali si coordinano all'interno di un singolo neurone per permettere che si verifichino i cambiamenti sinaptici (fig. 7) (Ye, 2012). Ripetuti shock dei nervi caudali (TNS, analogo del training di SENS) attivano, immediatamente e persistentemente, MAPK sia nel soma dei neuroni sensoriali sia nel neuropilo sinaptico. Al contrario, PKA è attivata immediatamente solo nel neuropilo ma, trascorsa un'ora dalla somministrazione del TNS, è attivata anche nei neuroni sensoriali. Il blocco dell'attivazione di MAPK durante, e non dopo, il TNS compromette l'attivazione di PKA nel neuropilo, ma non quella ritardata nel soma dei neuroni sensoriali. Inoltre, l'applicazione di inibitori al solo compartimento sinaptico dimostra che l'attivazione della MAPK sinaptica durante il TNS è necessaria per l'induzione della facilitazione sinaptica di medio termine, che porta all'attivazione sinaptica persistente di PKA, essenziale per mantenere questa facilitazione. Nell'insieme, questi risultati dimostrano che le cascate di segnali di MAPK e PKA sono integrate, in modo spazio-temporale, in uno stesso neurone, a supporto della plasticità sinaptica che è alla base della formazione della memoria (fig. 7) (Ye, 2012).

Il sistema di alimentazione di *Aplysia*, grazie al suo elevato grado di plasticità e ai suoi circuiti neuronali integrati e ben caratterizzati, si presta in modo particolare a ricerche sulla formazione della memoria. Per studiare le *pathway* che sono alla base della memoria di durata intermedia (ITM) di *Aplysia*, è stato usato il paradigma di apprendimento operativo: *"Learning that food is inedible"* (LFI), che consiste nel presentare ripetutamente alghe marine a un'*Aplysia*, impedendole, però, di cibarsene. Durante una singola sessione di training intensivo, *Aplysia* associa una specifica alga marina con l'impossibilità di mangiarla, generando una STM (30 minuti) e una LTM (24 ore). Questo protocollo di training intensivo induce anche una ITM, che dipende dalla sintesi di proteine temporalmente distinta, evidente per 4-6 ore dopo il training. Esperimenti *in vivo* dimostrano che la formazione di questa ITM richiede PKA, PKC (serina/treonina chinasi) e MAPK. Inoltre, il mantenimento di ITM necessita di PKA, PKM Apl III e MAPK, poiché l'inibizione di una qualunque di queste tre chinasi,

dopo il training o prima del test, blocca l'espressione della ITM. Al contrario, il mantenimento di LTM è indipendente da PKM Apl III. La fosforilazione intensa e duratura di MAPK dipende dalla sintesi di proteine, a differenza dell'attività di PKA e PKC. Il principale modulatore della memoria nelle diverse specie è l'orologio circadiano endogeno. Perciò la LTM operativa indotta dal training intensivo richiede sia la sintesi proteica sia segnali di chinasi persistenti, o sostenuti, per PKA, PKC e MAPK. Mentre le memorie temporalmente distinte (STM, ITM e LTM) sono indotte da uno stesso training, ci sono differenze rilevanti sia nella combinazione che nel *timimg* delle cascate dei segnali che inducono la loro formazione e mantenimento (Michel, 2012).

Il principale modulatore della memoria nelle diverse specie è l'orologio circadiano endogeno: chiarire i processi del suo funzionamento potrebbe essere la chiave per identificare e comprendere i meccanismi per migliorare la memoria. La modulazione circadiana proteina-fosfatasi dipendente dell'ITM (durata in ore) e i meccanismi della sua soppressione sono stati studiati in *Aplysia* usando ancora il paradigma di apprendimento operativo LFI. Si registra il numero dei tentativi fatti da *Aplysia* di ingerire il cibo, la loro durata e intensità. Dopo 2,5 ore di tentativi andati a vuoto, i parametri della risposta declinano. Ripetendo l'esercizio 24 ore dopo, il declino delle 3 risposte allo stimolo è più rapido, indicando una ritenzione di apprendimento. La ITM, forma di memoria temporalmente e meccanicisticamente distinta, è ritmicamente espressa durante il ciclo circadiano luce-buio e in condizioni costanti, sia che venga indotta con training intensivo che dilazionato nel tempo. Una forte regolazione circadiana dell'ITM si verifica con memoria esibita solo dagli esemplari di *Aplysia* che hanno avuto il training durante le prime ore del giorno soggettivo, mentre nessuna memoria è espressa da quelle alle quali il training è stato somministrato in tarda giornata o di notte. Poiché l'ITM necessita di cascate multiple e persistenti di chinasi, si è indagato se l'attività proteina fosfatasica influisce sulla modulazione circadiana. L'inibizione delle fosfatasi proteiche 1 e 2A blocca l'ITM negli individui che hanno ricevuto il training durante le prime ore del giorno, mentre risulta in un ricupero fase-specifico della memoria quando il training è stato somministrato in tarda giornata o in prima nottata. Al contrario, l'inibizione di CaN non blocca l'ITM negli animali sottoposti a training in prima giornata e permette l'ITM in quelli sottoposti a training in tarda giornata, in prima serata a durante la notte.

Questi risultati dimostrano che i livelli dell'attività proteina fosfatasica sono regolatori critici dell'ITM e rappresentano un meccanismo per mezzo del quale l'orologio circadiano regola la formazione della memoria (Michel, 2013).

Note

Nota 1. Assuefazione è uno stato di acquisita insensibilità da parte di un organismo a un determinato stimolo (o a una determinata droga o farmaco), in seguito a una stimolazione prolungata e ripetuta (o a una ripetuta somministrazione di stupefacenti o farmaci).

Nota 2. Disassuefazione è la perdita dell'assuefazione, dell'insensibilità a un determinato stimolo.

Nota 3. Fenomeno che consiste nell'acquisizione, da parte di un organismo, di un'abnorme reattività nei confronti di stimoli esterni/sostanze estranee con cui viene a contatto, induzione di uno stato di esaltata reattività per uno stimolo.

Nota 4. Facilitazione eterosinaptica: L'efficacia di una sinapsi viene potenziata da un'altra sinapsi.

BIBLIOGRAFIA

- Borradaile, L., Potts, F. A., Eastham, L. E. S., The invertebrata: A manual for the use of students, 4th Edition, Published by Cambridge at The University Press, 1963
- Carew, T. J., Castellucci, V. F., Kandel, E. R., An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. Int J. Neurosci, 1971; vol. 2: pp. 79-98
- Castellucci, V., Pinsker H., Kupfermann, I., Kandel E. R. , Neuronal Mechanisms of Habituation and Dishabituation of the Gill-Withdrawal Reflex in Aplysia. Science. 1970; vol. 167: pp. 1745-1748
- Glanzman, D. L., Habituation in *Aplysia*: The Cheshire Cat of neurobiology. Neurobiol. Learn. Mem.. 2009; vol. 92:pp. 147-154
- Kupfermann, I., Castellucci, V., Pinsker H., Kandel, E. R., Neuronal Correlates of Habituation and Dishabituation of the Gill-Withdrawal Reflex in Aplysia. Science. 1970; vol. 167: pp. 1743-1745
- Laboratory animal Europe. 2013; vol. 13, n.7: p. 30
- Meinkoth, N. The Audubon Field Guide to North America Seashore Creatures, New York Alfred A. Kuopf, Inc.,1981
- Michel, M., Green, C. L., Gardner, J. S., Organ, C. L., Lyons, L. C., Massed training-induced intermediate-term operant memory in aplysia requires protein synthesis and multiple persistent kinase cascades. Neurosci. 2012; vol. 33: pp. 4581-4591
- Michel, M., Gardner, J.S., Green, C. L., Organ, C. L., Lyons, L.C., Protein phosphatase dependent circadian regulation of intermediate-term associative memory. J. Neurosci. 2013; vol. 33: pp. 4605-4613
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., Kandel, E., Habituation and Dishabituation of the GM-Withdrawal Reflex in Aplysia. Science. 1970; vol. 167: pp. 1740-1742
- Rankin, C. H., & Carew, T. J., Dishabituation and sensitization emerge as separate processes during development in Aplysia. J. Neurosci. 1988; vol. 8: pp. 197-211
- Sharma, S. K., Bagnall, M. W., Sutton, M. A., and Carew, T. J., Inhibition of calcineurin facilitates the induction of memory for sensitization in Aplysia: Requirement of mitogen-activated protein kinase. PNAS USA. 2003; vol. 100: pp. 4861-4866
- Shimahara, T. & Tauc, L., Heterosynaptic facilitation in the giant cell of Aplysia. Physiol. 1975; vol. 247: pp. 321-341
- Walsh, J.P., and Byrne, J.H., FORSKOLIN MIMICS AND BLOCKS A SEROTONIN-SENSITIVE DECREASED K^+ CONDUCTANCE IN TAIL SENSORY NEURONS OF APLYSIA**.** Neurosci. Letters. 1984; vol. 52: pp. 7-11
- Ye, X., Marina, A., and Thomas T. J., Local synaptic integration of mitogen-activated protein kinase and protein kinase A signaling mediates intermediate-term synaptic facilitation in *Aplysia*. PNAS USA. 2012; vol. 109: pp. 18162-18167

APLYSIA CALIFORNICA, MODELLO ANIMALE PER RICERCHE SUL COMPORTAMENTO DI DIFESA CHIMICA ATTIVA E DI CONTROMISURE DIFENSIVE

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Aplysia californica modello per lo studio di meccanismi comportamentali di difesa attiva

Aplysia californica (fig. 1) è modello animale che trova applicazioni, oltre che in ricerche di neurobiologia, sull'apprendimento e sulla memoria, anche nella ricerca comportamentale. Lento e privo di guscio protettivo esterno, questo lumacone marino può contare su difese antipredatorie di tipo passivo, quali la colorazione mimetica della cute, il sapore repellente della pelle, della parete corporea e del muco, ma è anche capace di mettere in atto strategie difensive attive, di natura chimica e comportamentale. Quando si sente minacciata, *Aplysia* rilascia, nella cavità del mantello, due secreti ghiandolari che si mescolano dando luogo ad una miscela che viene spruzzata, mediante il sifone, contro il predatore di turno: uno è un inchiostro color rosso porpora, contenente H_2O_2, NH_3 e vari acidi, secreto in funzione difensiva, dalla ghiandola della porpora (fig. 2,3); l'altro, opaline, è prodotto dalla ghiandola dell'opaline (fig. 3) ed è una secrezione bianco-lattiginosa che polimerizza a contatto con l'acqua marina, diventando altamente viscosa e appiccicosa. Le due ghiandole sono sotto controllo neurologico indipendente.

Gli ingredienti repellenti e dissuasivi, presenti nell'inchiostro, per lo più non dipendono dalla dieta alimentare, ma sono prodotti dal metabolismo di *Aplysia* (Kicklighter, 2006). Sia l'inchiostro che opaline esplicano attività difensive grazie al loro sapore, ripugnante e disgustoso per i predatori. Il primo facilta la fuga delle *Aplysie* intrappolate dagli anemoni predatori (*Anthopleura sola*, fig. 4) nei quali suscita ritrazione e/o afflosciamento dei tentacoli, nonchè il rovesciamento gastrovascolare, essendo revulsivo; opaline, che induce una risposta alimentare, contiene concentrazioni elevate (centinaia mM) di L-lisina, di L-arginina e di altri aminoacidi liberi. Quando opaline e inchiostro si mescolano nella cavità del mantello, escapina, proteina presente nell'inchiostro e dotata di attività antimicrobica ed enzimatica

Fig. 1. *Aplysia californica* (Wikipedia)

Fig. 2. *Aplysia californica* sotto attacco: secrezione di inchiostro porpora (wikipedia.it)

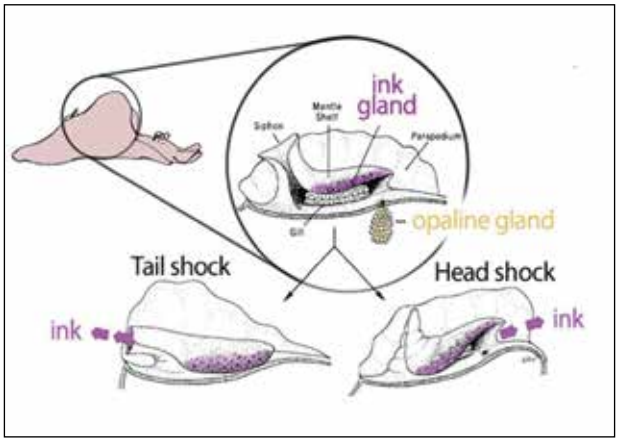


Fig. 3. *Aplysia californica*: rilascio di inchiostro a seguito di uno stimolo portato sulla coda o sul capo (da: Walters e Erickson, 1986)

(è una L-amminoacido-ossidasi), ossida L-lisina ed L-arginina presenti in opaline, catalizzando reazioni chimiche che producono una miscela di almeno 6 sostanze dotate di attività antipredatorie e antimicrobiche, in un reciproco equilibrio che è funzione del pH. A pH naturale (pH 5 alla secrezione, pH 8 dopo diluizione nell'acqua di mare) il principale componente della miscela, all'esame NMR ed alla spettrometria di massa, è l'acido cicloimmina-Δ^1-piperidina-2-carbossilico, seguito dagli acidi α-ammino-ε-caproico, Δ^1-piperidina-2-carbossilico e Δ^2-piperidina-2-carbossilico, insieme a concentrazioni mM di H_2O_2 e ammoniaca (Kamio, 2007).

Aplysia californica, modello per ricerche su meccanismi di difesa chimica

Sorprendentemente, escapina, tal quale o miscelata con il suo substrato amminoacidico o con opaline, messa a diretto contatto dei tentacoli di *Anthopleura sola*, non ne provoca la contrazione e/o l'afflosciamento. Per chiarire questo risultato inatteso, si è proceduto a un frazionamento dell'inchiostro guidato da bioassay. È stato così possibile isolare i componenti presenti nella porpora di *Aplysia californica* e individuare varie molecole, sia lipofile che idrofile, in grado di suscitare un comportamento aversivo nel predatore (Kiklinger, 2006). Per caratterizzarle e chiarire il/i loro meccanismo/i di azione, si è fatto ricorso a due test comportamentali, lo *squirting assay* e l'*ingestion assay*, il cui *test system* era il granchio blu (*Callinectes sapidus*), un predatore allopatrico, che in natura vive in un'area diversa da quella

Fig. 4. *Anthopleura sola* (da: imgur.com)

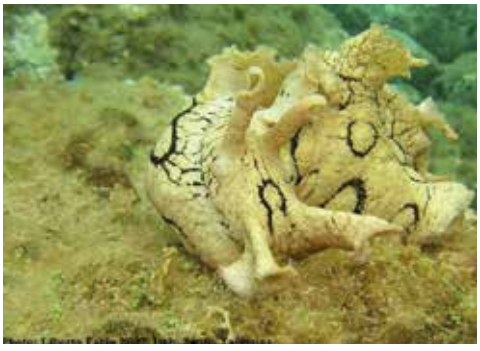


Fig. 5. *Aplysia dactylomela* (da: naturamediterraneo.com)

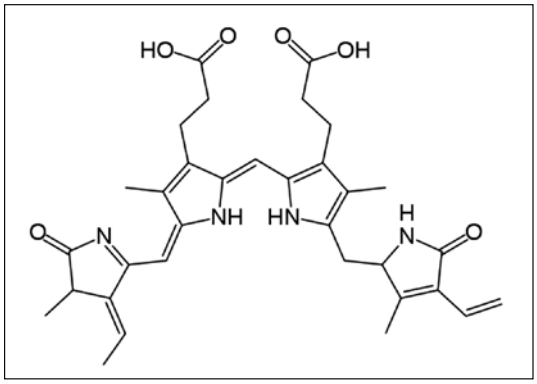


Fig. 6. Ficoeritrobilina: è una ficobilina di colore rosso, con un cromoforo tetrapirrolico ($C_{33}H_{38}N_4O_6$, massa molecolare 586.67) (da: Wikipedia)

di *Aplysia*. L'inchiostro, spruzzato sul o ingerito dal granchio, è risultato molto più efficace di opaline nel sopprimere nel predatore, inibendone le sensazioni chimiche, l'impulso aggressivo contro *Aplysia*. Inoltre, sempre con la tecnica del frazionamento, sono state individuate nell'inchiostro due molecole dotate di attività aversive contro il granchio blu: aplisioviolina, dotata di maggior potere deterrente, e ficoeritrobilina. Queste due sostanze derivano da una proteina fotosensibile presente nel sistema fotosintetico di alghe delle quali *Aplysia* si nutre e questo è il primo esempio della conversione, ad opera di un animale, di un pigmento fotosintetico in un deterrente chimico. Aplisioviolina, ficoeritrobilina (fig. 6) e H_2O_2 (pure quest'ultima è aversiva nei confronti del granchio blu) si trovano anche nell'inchiostro di *Aplysia dactylomela* (fig. 5), lumacone marino simpatrico col granchio blu (vivono nella stessa area). Ciò permette di ipotizzare che queste molecole siano potezialmente efficaci nelle interazioni predatore/preda, rilevanti per quanto riguarda l'ecologia (Kamio, 2010). La secrezione di inchiostro è la difesa chimica alla quale *Aplysia* fa ricorso più di frequente ed agisce sui sensori chimici dei predatori attraverso meccanismi diversificati.

Aplysia californica modello per lo studio di contromisure difensive: *distracting food mimic* (difesa tramite inattivazione sensoriale)

Meno comune è la secrezione di inchiostro che funziona da trappola/esca (*distracting food mimic* o *phagomimic*), sorta di contromisura che depista l'attacco del predatore, indirizzandolo verso una preda inesistente. Un altro possibile meccanismo di dissuasione e di difesa attiva è l'inattivazione sensoriale e mototria indotta nel predatore dall'inchiostro, che impedirebbe la ricezione, da parte del predatore, dell'odore di cibo associato ad *Aplysia*. Opaline, presente insieme all'inchiostro nella miscela difensiva, si appiccicherebbe sulle antenne, sull'apparato boccale e su altri annessi sensoriali del predatore, impedendo fisicamente l'accesso degli odori di cibo ai suoi chemosensori, o sovrastimolandoli (nel breve termine) o adattandoli (nel lungo termine). Quest'ipotesi è stata verificata usando, come modello di predatore, *Panulirus argus* (*Caribbean spiny lobster*), un astice acerrimo nemico di *Aplysia*, le cui antennule sono state pre-trattate con opaline, o esposte a riproduzioni mimate delle sue proprietà chimicofisiche. Sono stati confrontati gli effetti di questi trattamenti sulle risposte, all'odore di cibo, dei neuroni chemorecettoriali in antennule isolate di *Panulirus*, per valutarne l'effetto sull'input chemosensoriale, e sulle risposte motorie delle antennule di *Panulirus* intatti, per misurare l'effetto sul comportamento motorio del predatore guidato chimicamente. I risultati confermano l'ipotesi di partenza: opaline riduce l'output dei chemosensori sulle antennule, bloccando fisicamente la ricezione degli, e la risposta agli, odori provenienti dall'esca/*Aplysia*, e ciò ha un impatto paralizzante sulle risposte motorie aggressive di *Panulirus argus*, mentre *Aplysia* ne approfitta per allontanarsi. Questa è la prima dimostrazione sperimentale dell'inattivazione di sensori periferici in funzione antipredatoria (Love-Chezem, 2013).

Bibliografia

– Kamio, M., Ko, K. C., Zheng, S., Wang, B., Collins., S. L., Gadda, G., Tai, P. C., and Derby, C. D., The Chemistry of Escapin: Identification and Quantification of the Components in the Complex Mixture Generated by an l-Amino Acid Oxidase in the Defensive Secretion of the Sea Snail Aplysia californica. Chem. Eur. J. 2009; vol. 15: pp. 1597-1603

– Kamio, M., Grimes, T. V., Hutchins, M. H., van Dam, R., and Derby, C. D., The purple pigment aplysioviolin in sea hare ink deters predatory blue crabs through their chemical senses. Animal Behaviour. 2010; vol. 80: pp.89-100

– Kicklighter, C. E., & Derby, C. D., Multiple components in ink of the sea hare Aplysia californica are aversive to the sea anemone Anthopleura sola. Exp. Marine Biology and Ecology, 2006; vol. 334: pp. 256-268

– Love-Chezem, T., Aggio, J. F., Derby, C. D., Defense through sensory inactivation: sea hare ink reduces sensory and motor responses of spiny lobsters to food odors J. Exp. Biol. 2013; vol. 216: pp. 1364-1372

– Walters, E.T., Erickson, M.T., Directional control and the functional organization of defensive responses in *Aplysia*. J Comp Physiol A. 1986; vol. 159: pp. 339-351.

OCTOPUS VULGARIS, MODELLO ANIMALE IN RICERCHE SULL'EVOLUZIONE COMPARATA DEI MECCANISMI DI APPRENDIMENTO E MEMORIA

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Introduzione

Octopus vulgaris (Cuvier, 1797) è un mollusco della Famiglia *Octopodidae*, dell'Ordine degli *Ottopodi*, della Classe dei *Cefalopodi* (*Phylum* dei Molluschi). Comunemente chiamato polpo o piovra, è diffuso in tutti i mari e negli oceani, soprattutto nelle zone tropicali, subtropicali e temperate (in particolare, nel Mediterraneo e nell'Oceano Atlantico), dove frequenta, preferibilmente, profondità di 100-200 m (Berger, 2010; Rosania, 2014). Ha corpo ovale e pesa 2-3 kg; testa e corpo, fusi tra loro a formare il mantello, sono uniti al piede (di qui il nome Cefalopodi). I due occhi sono piccoli, laterali e sporgenti sulla testa (fig. 1); la pelle è liscia, ricca di cromatofori che mimetizzano rapidamente il polpo, e di iridòfori, cellule responsabili di riflessi e iridescenze cutanee. I cromatofori sono cellule pigmentate (nere, gialle, arancioni, rosse e blu) sotto il controllo del sistema nervoso (e forse anche di quello ormonale). I singoli cromatofori possono essere espansi o contratti, grazie a fibre muscolari inserite alla periferia di ogni cellula e assicurano massima rapidità del cambiamento del colore cutaneo; la loro densità è di diverse centinaia per mm². Le cellule si organizzano in gruppi, a formare gli organi cromatoforici. Altre strutture sono leucociti e iridociti. *Octopus vulgaris* possiede 8 tentacoli, uno dei quali, l'ectocotilo, è l'organo copulatore; ogni tentacolo ha 2 serie di ventose (fig. 2,3) e tastano, esaminano, esplorano l'ambiente, "sentono" attraverso il "sapore" e servono per catturare e avvinghiarsi alle prede, controllare ed esaminare oggetti vari e ancorarsi ad un substrato solido. Per contrastare la presa delle ventose è necessario uno sforzo notevole: per questa ragione, le ventose di *Octopus* sono un modello adatto per disegnare prototipi di ventose artificiali. A questo fine, la muscolatura, le proprietà sensoriali e le caratteristiche della superficie delle ventose sono studiate a fondo, insieme alla capacità dei tentacoli di avvinghiarsi a un oggetto in modo coordinato (Tramacere, 2014). Al centro dell'area dalla quale originano i tentacoli, sulla parte inferiore del corpo, c'è la bocca che termina con un robusto becco corneo, usato per rompere i gusci delle conchiglie e il carapace dei crostacei di cui *Octopus* si nutre; la lingua è ricoperta da denti e, vicino alla testa, c'è un sifone che "spara" getti dell'acqua usata per la respirazione e la locomozione.

Fig. 1. *Octopus vulgaris* (da: http://it.wikipedia.org/wiki/Octopus_vulgaris)

Fig. 2. *Octopus vulgaris* (da: feathercollector)

Fig. 3. *Octopus vulgaris*: si notino le 2 file di ventose/tentacolo e uno dei 2 occhi sul capo) (da: juniors bildarchiv/alamy)

Da 7 a 11 lamelle branchiali sono presenti nella parte posteriore del mantello. Privo di endo- ed esoscheletro, riesce a comprimere il corpo alla dimensione di un'arancia e possiede una "ghiandola del nero" che produce un liquido nerastro, che emette per nascondersi al nemico e confonderlo mentre fugge. In *Octopus* il rapporto massa cervello/massa corporea raggiunge valori massimi tra tutti gli invertebrati: il suo sistema nervoso centrale è grande e sviluppato (figg. 4, 5) e gli conferisce la capacità di apprendere azioni che dipendono dalla memoria: infatti, impara e può agire in base a stimoli visivi, tattili e chimici ed è molto intuitivo e curioso. Nell'oceano, *Octopus* è un generalista specializzato nella scelta della preda, ma è anche soggetto alla pressione di molti predatori ed è limitato nell'accesso a tane in cui rifugiarsi. E' animale solitario e territoriale e non interferisce con i suoi simili che abitano nelle vicinanze. E' prevalentemente notturno: esce dalla tana per cacciare ed è un attivo predatore, nutrendosi di bivalvi e gasteropodi. Con i bivalvi adotta una tecnica astuta: si avvicina silenziosamente alla preda, inserisce delicatamente un sasso tra le valve aperte e il bivalve non ha scampo. Le femmine vivono in tane o in crepe nelle rocce del fondo. Trascorsi 30 giorni circa dall'accoppiamento, depongono da 100.000 a 500.000 uova in acque profonde, attaccandole al soffitto della tana, o all'interno di conchiglie, lattine, bottiglie e anfore e non si allontana dalla covata. La durata dell'incubazione è funzione della temperatura dell'acqua: se questa non è calda, può durare fino a 4-5 mesi, durante i quali la femmina pulisce il nido, lo difende e digiuna, al punto che, poco dopo la schiusa delle uova, generalmente muore.

Il sistema nervoso centrale e l'intelligenza dei cefalopodi

Nel suo habitat marino, col corpo flessibile e con la possibilità di mimetizzarsi grazie ai cromatofori e agli iridòfori della pelle, *Octopus vulgaris* è molto diverso dagli altri animali intelligenti. Tuttavia, è storicamente modello animale per lo studio dei meccanismi cellulari dell'apprendimento e della memoria. I primi ricercatori individuarono aree cerebrali dedicate alla memorizzazione delle informazioni chemotattili e visive acquisite, e studiarono le modalità con le quali *Octopus* discrimina le forme visive. Ricerche più recenti hanno ulteriormente valutato l'abilità di apprendimento e di risolvere problemi di *Octopus* e studiato il sistema nervoso che è alla base dei suoi comportamenti.

L'intelligenza dei cefalopodi offre importanti aspetti comparativi nella comprensione dell'intelligenza di altre specie, perché si basa su un sistema nervoso fondamentalmente di-

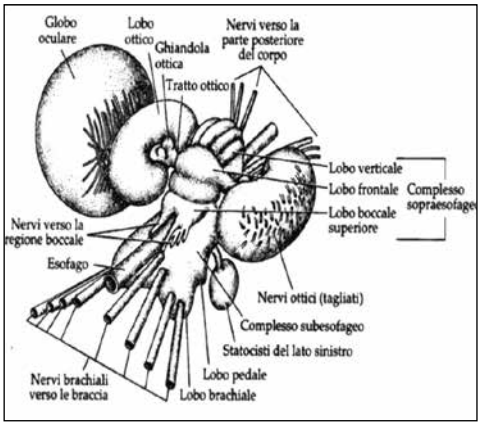


Fig. 4. Sistema nervoso di *Octopus vulgaris* (da: slideplayer.it)

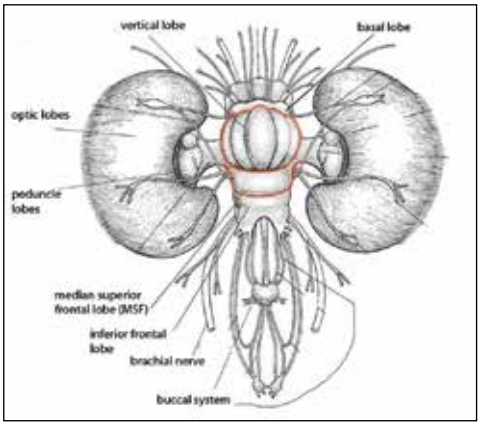


Fig. 5. Sistema nervoso di *Octopus vulgaris* (da: Carla Bertapelle, Dottorato di Ricerca, Università di Napoli Federico II)

verso da quello dei vertebrati. I cefalopodi, in particolare la sottoclasse dei Coleoidei (calamari, seppie e *Octopus*), sono considerati i più intelligenti tra gli invertebrati e sono esempi importanti di animali con evoluzione cognitiva avanzata. La portata dell'intelligenza dei cefalopodi è controversa, complicata dalle difficoltà che si incontrano nello studio di creature così elusive e fondamentalmente diverse dai vertebrati. Ciononostante, la presenza di un'impressionante capacità di apprendimento spaziale, di capacità nautiche e natatorie e di strategie predatorie è universalmente riconosciuta ai cefalopodi.

Octopus vulgaris è l'invertebrato col sistema nervoso più grande e sviluppato (figg. 4,5), che conta oltre 500 milioni di neuroni (contro i 100 miliardi di quello umano) distribuiti lungo tutto il corpo: il 40-45% di queste cellule nervose si trova nei 40 lobi del sistema nervoso centrale, che circonda l'esofago. Il lobo verticale (LV) ricorda, nella forma, l'ippocampo dei vertebrati (Hochner, 2006) (figg. 4,5) e si pensa che sia alla base di capacità simili, incluse la memoria, sia di breve che di lungo termine, la capacità di risolvere problemi e di distinguere tra forme e oggetti diversi, di sensibilizzazione e di assuefazione, di apprendimento associativo e spaziale. I grandi lobi ottici dietro gli occhi di *Octopus* (figg. 4,5) sono organizzati in tre strati corticali, simili alla retina dei vertebrati e contengono altri 120-180 milioni di neuroni (Hochner, 2006).

Il cervello umano è di notevoli dimensioni, è potente e ha un lobo frontale molto sviluppato, che gestisce le funzioni esecutive, ma questa sorta di "encefalizzazione centralizzata" non è l'unica soluzione evoluzionistica di sviluppo di un'intelligenza notevole: quello di *Octopus* può essere considerato un nuovo e diverso tipo di intelligenza. Due terzi delle cellule nervose di *Octopus* (~330 milioni) si trovano nei tentacoli. Questa insolita distribuzione dei neuroni permette a ogni singolo tentacolo di agire autonomamente nell'esecuzione delle istruzioni provenienti dal sistema nervoso centrale o generate all'interno del tentacolo stesso da stimoli tattili, chimici e nocicettivi (Tramacere, 2014). Infatti, la configurazione neuronale di *Octopus* permette alle otto braccia, o tentacoli, indipendenti e flessibili, di agire e di portare a termine, da sole o in coordinazione tra loro, compiti complessi: sono capaci di eseguire con successo sequenze logiche di azioni quali l'uso di strumenti, svitare coperchi e persino aprire chiusure di sicurezza a prova di bambino e di sottrarsi ad un stimolo nocivo (Hague, 2013),

senza impigliarsi tra loro, grazie a un meccanismo di autoriconoscimento. Ma, nell'eseguire azioni come la cattura delle prede e le esplorazioni tattili, i tentacoli corrono seri rischi di andare incontro a danneggiamenti e amputazioni. Riflessi nocicettivi rappresentano una prima reazione di difesa.

Tentacoli, rimossi subito *post mortem*, sono stati montati verticalmente o orizzontalmente e sono state video-registrate le risposte a una pizzicata della parte distale, o alla deposizione di acido acetico 0,1-0,5% o di acqua di rubinetto, sulla punta del tentacolo isolato. I tentacoli montati verticalmente si sono rapidamente ritirati (~1 sec) in risposta ai 3 stimoli applicati al loro apice, mentre si è formata una specie di articolazione/giuntura prossimale, nei tentacoli montati orizzontalmente. Nessuna risposta è stata evocata dall'applicazione di acqua di mare o da una leggera compressione. Le risposte di ritrazione sono state annullate dalla resezione, prossimale al sito di stimolazione, del cordone nervoso assiale presente nel tentacolo.

Questi risultati dimostrano che i tentacoli di *Octopus* sono capaci di ritrazione riflessa a fronte di uno stimolo nocivo, senza coinvolgimento del cervello (Hague, 2013). In altre parole, il sistema nervoso centrale di *Octopus* non è disturbato da continui segnali di bassa intensità provenienti dai (afferenti)/diretti ai (efferenti) tentacoli: questi operano di loro autonoma iniziativa, affascinante alternativa ai nostri arti che presentano articolazioni e sono controllati dal cervello.

Ispirati dagli *Octopus*, esperti di robotica stanno lavorando per incorporare sistemi di controllo decentralizzati in flessuose braccia robotiche artificiali. Tecniche predatorie, destrezza nell'usare strumenti e compiere manovre, capacità di comunicare proprie di alcune specie di calamari, facilità e capacità di apprendimento fanno dei molluschi cefalopodi animali dotati di incredibile intelligenza.

L'uso degli *Octopus* in ricerca è stato a lungo limitato dalle difficoltà di mantenere questi animali in acquari di laboratorio. In qualche modo, gli *Octopus* si adattano alla vita in cattività, si acclimatano al loro acquario nel giro di pochi giorni, comportandosi spesso come animali domestici. D'altro canto, non vivono a lungo, tendono al cannibalismo, la sovrapposizione temporale tra due generazioni consecutive è breve e sia i maschi che le femmine deperiscono e muoiono, non molto tempo dopo l'accoppiamento.

Octopus vulgaris modello animale di studio evolutivo e comparato del potenziamento di lungo termine

I meccanismi cellulari alla base dei processi di apprendimento e memoria sono stati studiati su sezioni cerebrali di LV del cervello di *Octopus*, area coinvolta in questi processi. Registrazioni dei potenziali di campo hanno evidenziato un potenziamento di lungo termine (LTP) dei potenziali di campo sinaptici glutammatergici, simile a quelli che si registrano nell'ippocampo dei vertebrati. LTP è un fenomeno di plasticità sinaptica che consiste nell'aumento dell'efficacia di una sinapsi, come conseguenza di un particolare tipo di stimolazione o di attività endogena.

Questi risultati suggeriscono che un'evoluzione convergente abbia portato alla selezione di processi sinaptici dipendenti da attività similari, che mediano forme complesse di apprendimento e memoria in vertebrati e invertebrati (Hochner, 2003). Così, l'analisi comparata dei meccanismi cerebrali degli invertebrati dotati di comportamenti sofisticati come i cefalopodi, può far progredire la nostra comprensione dei processi neurali coinvolti nella mediazione di comportamenti complessi espressi da vertebrati.

Gli *Octopus* sono un modello animale ideale per questo studio comparato perché, insieme agli altri cefalopodi moderni, si sono evoluti da saprofagi, lenti e protetti da un guscio, in predatori agili e veloci che condividono ambiente e modo di vivere con pesci con i quali competono

con successo. Il comportamento degli *Octopus* è mediato da un cervello centrale altamente sviluppato, il cui LV (figg. 4,5) è coinvolto nell'apprendimento e nella memoria. La rimozione del LV danneggia gravemente il richiamo della memoria di lungo termine e la capacità di imparare nuovi compiti, oltre a menomare l'abilità, esclusiva degli *Octopus,* di apprendere un esercizio osservando un altro *Octopus* "dimostratore", precedentemente addestrato (Fiorito e Scotto, 1992; Fiorito e Chichery, 1995). Nel LV ci sono solo due tipi di neuroni identificati morfologicamente: ~25 milioni di piccoli interneuroni amacrini[1] che formano sinapsi con sole ~65.000 grandi cellule efferenti. E' stato ipotizzato che questi neuroni, e le loro connessioni con gli 1,8 milioni di cellule afferenti dal lobo frontale mediale superiore (LFMS), formino una matrice associativa analoga all'ippocampo dei vertebrati (Young, 1995). Altri Autori, esaminando su preparazioni di fettine ottenute dal LV, i processi neurali che sono alla base dell'eccezionale capacità di apprendimento degli *Octopus*, hanno trovato che il LV manifesta una LTP simile a quella dei vertebrati, suggerendo un'evoluzione convergente dei processi sinaptici che sono alla base di forme complesse di apprendimento (Hochner, 2003). La registrazione di un potenziale di campo ottenuta da una sezione di LV di *Octopus*, area coinvolta in forme complesse di LTP (Fiorito e Chichery, 1995), condivide alcune analogie strutturali con registrazioni fatte nell'ippocampo di vertebrati. L'LV mostra una robusta plasticità sinaptica attività-dipendente, che ricorda aspetti della LTP dei vertebrati. Ciò potrebbe indicare che processi cellulari simili siano stati selezionati, durante l'evoluzione di animali filogeneticamente tra loro molto lontani, con forme complesse di apprendimento. A sua volta, questa constatazione suggerisce che la LTP emerga da meccanismi importanti per processi di apprendimento complessi, rafforzando il parallelismo, tuttora controverso, tra LTP, apprendimento e memoria (Martin, 2000).

Come in differenti parti dell'ippocampo, nell'LV di *Octopus* si distinguono chiaramente due diversi tipi di meccanismi di induzione della LTP: il primo dipende dalla risposta post-sinaptica, mentre l'induzione del secondo, che non richiede una forte risposta post-sinaptica, potrebbe essere interamente mediata all'interno del dominio pre-sinaptico, o a livello post-sinaptico, dalla trasmissione non ionotropa glutammatergica, da un differente trasmettitore o anche da meccanismi di bassa soglia, che possono essere attivati da una residua risposta post-sinaptica glutammatergica non bloccata. Almeno una delle forme di induzione dell'LTP in *Octopus* ha proprietà simili alla LTP associativa NMDA-dipendente[2] nelle sinapsi dell'ippocampo dei vertebrati e almeno alcune delle connessioni nel LV mostrano proprietà basali della plasticità sinaptica di tipo Hebbian[3]. In questo contesto, l'obiettiva impossibilità di dimostrare la presenza di una componente NMDA-simile nel potenziale di campo sinaptico, o il suo coinvolgimento nell'induzione della LTP, genera perplessità e porta a ipotizzare l'evoluzione, in *Octopus,* di un meccanismo non-NMDA per la plasticità sinaptica associativa. Questo risultato è ancor più sconcertante poiché *Aplysia californica* (mollusco gasteropode opistobranchio) mostra correnti NMDA-simili, per quanto insensibili a APV[4], e una plasticità omosinaptica[5] APV-sensibile (Hochner, 2003). E' molto improbabile che una farmacologia specie-specifica abbia impedito l'osservazione di effetti NMDA-simili, poiché correnti sensibili ad APV e MK-801[6], indotte da L-glutammato/NMDA, sono state registrate in cellule muscolari di cromatofori di calamaro. Per chiarire questo punto, si dovrebbe cercare la presenza di correnti e recettori NMDA-simili e verificare se altri processi, come ad esempio correnti di Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, affianchino i meccanismi NMDA nell'induzione della LTP. I cambiamenti netti e tipici, associati all'LTP, delle proprietà dinamiche dei potenziali di campo sinaptici, indicano con evidenza che la LTP nell'LV comporti modifiche pre-sinaptiche. Ciò rende il meccanismo della LTP indotta post-sinapticamente in *Octopus,* piuttosto simile a quello ipotizzato per le *mossy fiber synapses*[7] dei mammiferi, perché la sua espressione è pre-sinaptica, anche se è indotta post-sinapticamente, più probabilmente da un meccanismo insensibile all'APV.

Poiché *Octopus* è molto più avanzato evoluzionisticamente dei molluschi tipo *Aplysia,* la cui plasticità sinaptica è stata caratterizzata nei dettagli, risulta particolarmente interessante confrontare i meccanismi di plasticità evoluti nel suo LV a quelli presenti in *Aplysia*. La serotonina, potente neuromodulatore eterosinaptico, sia della plasticità di breve che di lungo termine in *Aplysia*, non risulta coinvolta direttamente nella LTP di *Octopus*, nel quale un meccanismo omosinaptico glutammatergico potrebbe essersi evoluto come il più adatto a un *network* di apprendimento associativo. Si suppone che nello sviluppo di *Aplysia* sia coinvolto un processo fondamentalmente simile, sebbene APV-sensibile, che contribuisce parzialmente ad una forma semplice di apprendimento associativo. Probabilmente, questo meccanismo è comparso presto, nell'evoluzione dei molluschi, ed è stato selezionato e conservato in un'area cerebrale che evolveva per mediare l'apprendimento all'interno di comportamenti cognitivi complessi (Hochner, 2003).

Octopus vulgaris modello nello studio e nell'analisi comparata dell'evoluzione dei meccanismi di apprendimento e memoria

I meccanismi di plasticità presenti nei molluschi più primitivi sono conservati nel sistema LFSM-LV di *Octopus*? La risposta a questa domanda ci viene dai risultati di numerose ricerche che dimostrano che la serotonina (5-HT) gioca, in *Aplysia,* un ruolo nella plasticità sinaptica sensomotoria, sia di breve che di lungo termine, importanti nelle forme semplici di apprendimento e memoria (Hawkins, 2006). Al contrario, solo concentrazioni molto più elevate di 5-HT (~100 μM), localizzata immuno-istochimicamente nell'area pertinente dell'LV di *Octopus vulgaris*, hanno un forte effetto facilitatorio sull'ampiezza del potenziale di campo post-sinaptico (Shomrat, 2005).

Questi risultati indicano che, a differenza dei suoi effetti in altri molluschi, 5-HT ha solo effetti di breve termine nell'LV di *Octopus*. Applicazioni ripetute di 5-HT non portano, in *Octopus,* a un potenziamento di lungo termine, come accade invece in *Aplysia* (Montarolo, 1986).

Quali sono i meccanismi molecolari che mediano i processi di apprendimento e memoria in *Octopus*? Vari studi farmacologici nei cefalopodi hanno mostrato gli effetti di farmaci sul comportamento di apprendimento e memoria e suggeriscono meccanismi biochimici plausibili per spiegare la mediazione cellulare di questi processi. Ci sono dati a supporto di un possibile coinvolgimento di NO (nitrossido) sia nell'apprendimento che della memoria di *Octopus* (Robertson, 1996). Inoltre, approfondite ricerche biochimiche e immunoistochimiche hanno dimostrato la presenza di un sistema NO nel cervello dei cefalopodi. L'acetilcolina, probabilmente, è coinvolta nell'apprendimento visivo, dato che la scopolamina (antagonista reversibile dell'aceticolina ai recettori colinergici muscarinici) compromette questa funzione in *Octopus*. Non solo, nella seppia è stato dimostrato che cicloesimide, inibitore della sintesi proteica, iniettata 1-4 ore dopo una sessione di training visivo, interferisce con la memoria di un compito comportamentale (Agin, 2003). Similmente, citocalasina D^s blocca l'apprendimento da tatto in *Octopus vulgaris*.

Sebbene questo/i sito/i di azione farmacologica non sia/siano stato/i chiarito/i da queste ricerche, è sembrato utile investigare gli effetti di questi modulatori sulle proprietà fisiologiche del sistema LFSM-LV e delle sue proprietà plastiche di breve e di lungo termine. I risultati che emergono da ricerche di elettrofisiologia in *Octopus* indicano che un processo evoluzionistico convergente ha portato alla selezione di *network* e plasticità sinaptica simili in specie evoluzionisticamente molto lontane, ma che sono evolute in comportamenti e modelli di vita simili.

Tali considerazioni evoluzionistiche danno fondamento all'importanza di queste proprietà cellulari e morfologiche per sistemi neurali, che mediano forme complesse di apprendimento e memoria. In particolare, la somiglianza dell'architettura e della connettività fisiologica del sistema LFSM-LV di *Octopus* con l'ippocampo dei mammiferi e il numero molto elevato di piccoli interneuroni nella sua area di apprendimento e memoria, suggeriscono l'importanza di un gran nu-

mero di unità che, indipendentemente, formano un'alta ridondanza di connessioni. Poiché queste strutture si ritrovano sia nel sistema LFSM-LV di *Octopus* che nell'ippocampo dei vertebrati, pare evidente che esse sono indispensabili per creare una grande capacità per associazioni di memoria (Hochner, 2006). Tuttavia, la convergenza non è completa, perché non tutte le strutture del sistema LFSM-LV di *Octopus* sono analoghe a quelle dell'ippocampo: l'LV di *Octopus* mantiene ancora l'organizzazione morfologica di base dei gangli degli invertebrati, con neuroni monopolari i cui corpi cellulari sono organizzati in uno strato esterno e che inviano i loro processi a un neuropilo[9] interno. Inoltre, analisi biofisiche rivelano la natura refrattaria all'eccitabilità della membrana dei corpi cellulari dei neuroni di LV e LFSM, più tipica dei neuroni degli invertebrati.

In base a questi risultati si può concludere che il "linguaggio" della comunicazione tra neuroni, determinato dalla struttura cellulare e dalle proprietà di membrana, è più specie-specifico. Al contrario, la struttura del *network* e il cablaggio dei circuiti nervosi, insieme a un qualche tipo di plasticità sinaptica attività-dipendente, sono fondamentali per le strutture cerebrali dedicate all'apprendimento e alla memoria (Hochner, 2006).

Valutazione funzionale e comparata del sistema di apprendimento e memoria del modello animale *Octopus vulgaris*

Octopus, e i suoi parenti stretti seppie e calamari, sono gli invertebrati più avanzati, possedendo il cervello più grande sia per massa che per numero di cellule. Recentemente, sono state riviste le proprietà neurofisiologiche dell'LV nel cervello dei cefalopodi, sistema già considerato dedicato all'apprendimento e alla memoria.

Dal punto di vista dell'evoluzione comparata, questi risultati sono stati messi in confronto con altri sistemi per i quali sono disponibili dati anatomici ed elettrofisiologici, in particolare i *mushroom bodies*[10], o *corpora pedunculata*, degli insetti e l'ippocampo dei mammiferi.

L'LV dei cefalopodi e il *mushrooms body* degli insetti sono strutture cerebrali esclusive coinvolte nel comportamento avanzato di questi animali. I risultati ottenuti da questo confronto suggeriscono che un processo evoluzionistico convergente abbia portato a una simile organizzazione neurale e a una plasticità sinaptica di lungo termine attività-dipendente, in tutti questi sistemi di apprendimento e memoria, anche se i sistemi degli invertebrati conservano le loro tipiche caratteristiche anatomiche ed elettrofisiologiche (Hochner, 2010).

La domanda più stimolante nelle neuroscienze riguarda il modo in cui il sistema nervoso controlla i comportamenti complessi. Sebbene non sia facile definire quantitativamente i livelli di complessità comportamentale, c'è un consenso generale su alcune correlazioni positive tra il livello di complessità comportamentale e la complessità del sistema nervoso o, come prima stima, tra la complessità comportamentale e il numero delle cellule nervose. Questa relazione è dimostrata in modo più evidente negli invertebrati che mostrano la maggior complessità nella diversità comportamentale e questa diversità correla, pressapoco, con la grande diversità nella complessità, o dimensione, del loro sistema nervoso.

Per esaminare il controllo di semplici forme di comportamento si può studiare il sistema nervoso di *Caenorhabditis elegans*[11], verme nematode del terreno, che consta di 302 neuroni, mentre *Octopus vulgaris*, con i suoi circa 500 milioni di neuroni, è il modello animale più adatto per studiare comportamenti complessi. Un siffatto approccio comparato è affascinante perchè permette di chiederci se i meccanismi neurali di organismi semplici, come i nematodi, siano conservati nel molto più complesso *Octopus* o se i comportamenti complessi di *Octopus* implichino l'evoluzione di meccanismi e processi più progrediti, forse convergenti con quelli di vertebrati evoluti (Hochner, 2010).

Molteplici matrici nel sistema della memoria di *Octopus*

La capacità di creare e mantenere la memoria è distribuita, in *Octopus*, tra varie matrici distinte. Questa distribuzione implica che ogni area contribuisca a una parte del tutto e che anche i *record* siano distribuiti in ogni parte. I risultati della rimozione di singoli lobi, o di loro parti, confermano che la memoria è distribuita esattamente in questo modo. Ogni matrice della sequenza gioca una parte diversa nell'intero processo, ma nessuna è singolarmente essenziale.

Sistemi così distribuiti, strutturati e organizzati in numerosi canali in una serie di matrici, assicurano le caratteristiche necessarie per la formazione e il mantenimento di una memoria funzionale, consentendo: 1) la *fault tolerance* (tolleranza a guasti, o a errori, che assicura continuità di funzionamento anche in presenza di danni), 2) la *generalization* (semplificazione), e 3) la *completion,* (la capacità di portare a termine azioni, cioè il riconoscimento di situazioni, nonostante le loro variazioni (Young, 1995)).

I sistemi di apprendimento visivo e tattile sono distinti in *Octopus*, ma presentano alcune sopvrapposizioni. Nel sistema visivo, gli impulsi provenienti da gruppi di recettori retinici passano attraverso i lobi ottici e, poi, attraversano una serie di ulteriori 4 matrici ottiche di assoni intersecanti. Con appropriati cambiamenti sinaptici, questi formano associazioni tra combinazioni di segnali di eventi visivi e le loro conseguenze, producendo in *Octopus* un comportamento di attacco o di ritirata. La memoria tattile consiste essenzialmente in 4 matrici, ma gli impulsi tattili provenienti dai tentacoli hanno accesso anche ai centri visivi, in modo che non meno di 8 centri sono coinvolti. Un danno inferto a uno di questi centri riduce l'accuratezza della discriminazione appresa tra oggetti rugosi e oggetti lisci. La disposizione delle matrici richiama quella dell'ippocampo dei mammiferi e dei centri neocorticali associati: ci sono 3 *pathway* ricorrenti che rinforzerebbero le connessioni. Queste rappresentano esempi eccellenti di come memorie di situazioni complesse possano essere impostate da impulsi di passaggio provenienti da numerosi canali, attraverso una serie di matrici (Young, 1995).

Conclusioni

Octopus vulgaris è uno strano animale, risultato di un'evoluzione che 500 milioni di anni fa si è separata da quella di insetti, uccelli, rettili e mammiferi: ha un corpo sorprendentemente flessuoso, tentacoli tempestati di ventose, capacità mimetiche sorprendenti - può assumere rapidamente sembianze convincenti e tranquillizzanti, come quella di una pianta marina o di un fondale sabbioso - risolve labirinti, apre barattoli, usa strumenti e ruba piccoli oggetti del laboratorio. *Octopus* sono stati sorpresi a raccogliere e trasportare goffamente, mezzi gusci di noci di cocco lungo i fondali marini sabbiosi delle coste indonesiane: per costruirsi un ricovero mobile, si rinchiudono all'interno della sfera formata da due mezzi gusci e si lasciano andare dove li porta il mare. Questo è un esempio straordinario, perché suggerisce la presenza, in questi molluschi, di un autentico comportamento di prudenza e di precauzione. C'è chi addirittura attribuisce a *Octopus* una sofisticata vita interiore.

Ma ciò che più sconcerta in *Octopus* è il cervello, molto evoluto, ma diverso da quello di qualunque animale che noi giudichiamo intelligente. Infatti, il cervello di *Octopus* è così diverso dal nostro, e da quello degli animali che siamo soliti studiare, da farci intravvedere la possibilità di sviluppi eccezionali: se saremo in grado di capire come *Octopus* gestisce le sue complesse imprese cognitive, forse potremo avvicinarci alla scoperta di alcuni elementi fondamentali del pensiero e sviluppare nuove teorie sul modo in cui le capacità mentali sono evolute.

Note

1. Interneuroni amacrini: cellule nervose prive di assone in un circuito nervoso e che intervengono nei meccanismi di integrazione. Connettendo neuroni afferenti con quelli efferenti, gli interneuroni integrano i circuiti di ciascuna area cerebrale, se necessario trasformando, ad esempio, un'attivazione in un'inibizione. Hanno una funzione associativa (possono ricevere, ma anche fornire informazioni), permettendo di integrare le informazioni neurosensoriali tra i diversi strati.

2. Il recettore NMDA (N-Metil-D-Aspartato) è un recettore postsinaptico dell'acido glutammico. È un recettore ionotropico (una classe di recettori che funzionano essi stessi da canali ionici, dopo legame col rispettivo ligando e/o attivazione da parte di altri fattori) che lascia fluire ioni Na^+ e Ca^{2+} all'interno del neurone e ioni K^+ al suo esterno. Consiste di svariate subunità, le più interne delle quali costituiscono la parete del canale ionotropico che permette il flusso degli ioni attraverso la membrana plasmatica.

3. Plasticità sinaptica di tipo Hebbian. Hebb formulò una teoria in neuroscienze che cerca di spiegare l'adattamento dei neuroni cerebrali durante i processi di apprendimento. Descrive un meccanismo di base per la plasticità sinaptica per cui un aumento dell'efficacia sinaptica deriva dalla stimolazione ripetuta e persistente della cellula post-sinaptica.

4. D,L-2-amino-5-fosfonovalerato (APV), è un antagonista selettivo per la sottoclasse NMDA dei recettori del glutammato.

5. Per plasticità sinaptica s'intende la capacità del cervello di adattarsi e modificarsi in seguito alle esperienze fatte. La capacità di crescita e di modellamento delle sinapsi, processo che persiste per tutta la vita, consiste in modificazioni strutturali che sono alla base dei processi di apprendimento e memoria, sia motoria che cognitiva, e dei processi di adattamento dell'organismo in risposta ai cambiamenti ambientali. Quando il potenziamento della trasmissione sinaptica dura più di 30 minuti si parla di potenziamento di lungo termine (LTP). Plasticità omosinaptica è l'aumento dell'efficacia della trasmissione sinaptica per effetto dell'attività sostenuta dalla sinapsi stessa (facilitazione omosinaptica) o della concomitante attività di un altro neurone (facilitazione eterosinaptica)

6. (+)-MK 801 è un potente antagonista non competitivo di NMDA. Si lega in modo reversibile e il suo legame mostra specificità regionale, essendo i suoi siti di legame prevalentemente localizzati nell'ippocampo.

7. Le *granule cells* del giro dentato dell'ippocampo formano caratteristici assoni non mielinati che proiettano lungo la pathway delle *mossy fiber* al *Cornus Ammonis area 3* (CA3). Gli assoni emergono dalle porzioni basali delle *granule cells* e passano attraverso l'ilo del giro dentato dell'ippocampo, prima di entrare nello *stratum lucidum di CA3*. Le sinapsi delle *granule cell* tendono a essere glutammatergiche (eccitatorie), anche se dati immunmoistologici hanno indicato che alcune sinapsi contengono elementi neuropeptidergici inclusi peptidi oppiacei, come dinorfina e encefaline. Inoltre, è sempre più evidente una co-localizzazione di neurotrasmettitori GABAerici e glutammatergici all'interno dei terminali delle *mossy fiber*, il cui significato funzionale non è stato ancora chiarito.

8. - La citocalasina D è una tossina a effetto rabdomiolitico, prodotta da alcuni Mixomyceti che hanno la capacità di parassitare altre specie fungine, che a loro volta diventano responsabili di episodi di sindrome rabdomiolitica. Essa impedisce la creazione dei microfilamenti actinici durante la mitosi, cioè fa in modo che i cromosomi non possano dividersi durante la divisione della cellula (profase).

9. In neuroanatomia, il neuropilo è la regione compresa tra i vari corpi cellulari (*pirenofori*) dei neuroni della sostanza grigia dell'encefalo e del midollo spinale. Consiste di un denso intreccio di terminali assonici, dendriti e processi delle cellule gliali (astrociti e oligodendrociti); comprende anche le connessioni sinaptiche tra le ramificazioni assoniche e i dendriti.

10. The *mushroom bodies* o *corpora pedunculata* sono una coppia di strutture del cervello degli insetti, altri artropodi e alcuni anellidi, in particolare i policheti della la famiglia delle *Nereididae*. Sono anche note per il ruolo che giocano nell'apprendimento e memoria olfattivi.

11. *Caenorhabditis elegans* è un verme nematode fasmidario, lungo circa 1 mm, che vive nel suolo, in regioni temperate. Si tratta di un organismo modello molto usato nello studio della biologia dello sviluppo e dell'apoptosi. Le prime ricerche su *C. elegans* sono state avviate nel 1962 da Sydney Brenner. Per le scoperte sul lignaggio cellulare (riguardanti cioè la descrizione dello sviluppo dell'organismo a livello spaziale e temporale) e sull'apoptosi, Brenner vinse il Nobel nel 2002.

Bibliografia

- Agin, V., Chichery, R., Maubert E., and Chichery, M.-P., 2003; Time-dependent effects of cycloheximide on long-term memory in the cuttlefish. Pharmacol. Biochem, Bahav., vol. 75: pp. 141-146
- Berger, E., 2010; Aquaculture of Octopus species: present status, problems and perspec-

tives. The Plymouth Student Scientist, vol. 4: pp. 384-398
– *Fiorito, G., and Scotto, P., 1992;* Observational Learning in Octopus vulgaris. *Science, v*ol. 256: pp. 545-547Graziano Fiorito
– Laboratorio di Neurobiologia, Stazione Zoologica A. Dohm di Napoli, 1-80121 Napoli, Italy
– Find this author on Google Scholar
– Find this author on PubMed
– Search for this author on this site
– Pietro Scotto
– Cattedra di Fisiologia Umana, Università di Reggio Calabria, 1-88100 Catanzaro, Italy
– Find this author on Google Scholar
– Find this author on PubMed
– Search for this author on this site
– Fiorito, G., and Chichery, R., 1995; Lesions of the vertical lobe impair visual discrimination learning by observation in Octopus vulgaris. Neurosci. Lett. vol. 192: pp. 117-120
– Hague, T., Florini, M., & Anders, P. L. R., 2013; Preliminary in vitro functional evidence for reflex responses to noxious stimuli in the arms of Octopus vulgaris. J. Experim. Marine Biol. and Ecol., vol. 447: pp. 100-105
– Hawkins, R. D., Kandel, E. R., amdBailey, C. H., 2006; Molecular mechanisms of menory storage in Aplysia. Biol. Bull., vol. 210: pp. 174-191
– Hochner, B., Brown, E. R., Langella, M., Shomrat, T., and Fiorito, G., 2003; A learning and memory area in the octopus brain manifests a vertebrate-like long-term potentiation. J. Neurophysiol., vol. 90: pp. 3547- 3554
– Hochner, B., Shomrat, T. and Fiorito, G., 2006; The Octopus: A Model for a Comparative Analysis of the Evolution of Learning and Memory Mechanisms. Marine Invertebrate Models of Learning and Memory, vol. 10; pp. 308-317
– Hochner, B., 2010; Functional and comparative assessments of the octopus learning and memory system. Front. Biosci., vol. 2: pp.764-771
– Martin, S. J. , Grimwood, P. D. , and Morris, R. G. M., 2000; SYNAPTIC PLASTICITY AND MEMORY: An Evaluation of the Hypothesis. Annu. Rev. Neurosci., vol. 23: pp. 649-711
– Montarolo, P. G., Goelet, P., Castellucci, V. F., Morgan, J., Kandel, E. R., and Schacher, S., 1986; A critical period for macromolecular sinthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. Science, vol. 234: pp.1249-1254
– Robertson, J. D., Bonaventura, J., Komh, A., and Hiscat, M., 1996; Nitric oxide is necessary for visual learning in *Octopus vulgaris*. Proc. Biol. Sci., vol, 263: pp. 1739-1743
– Rosania, K., 2014; The autonomous arms of Octopus. Lab Animal Europe, vol. 14: p. 35
– Shomrat, T., Feinstein, N., Klein, M., and Hockner, B., 2005; The involvment of serotonin and octopamine in short- and long-term plasticity in the octopus vertical lobe. Abstract 655.10 [Online: Abstract Viewer/Itinerary Planner]. Society for Neuroscience, Washington, DC.
– Tramacere, F., Kovalev, A., Kleinteich, T., Gorb, S.N., and Mazzolai, B., 2014; Structure and mechanism properties of Octopus vulgaris suckers. J. R., Soc. Interface, Feb 6; 11(91): 20130816. Doi: 10.1098/rsif.2013.0816
– Young, J. Z., 1995; Multiple matrices in the memory system of octopus. In: Cephalopod Neurobiology, edited by Abbott, J. N. , Williamson, R., and Maddock, L., Oxford: Oxford University Press, 1995, p. 431–443

IL TRITONE *PLEURODELES WALTL*, MODELLO ANIMALE IN RICERCHE DI BIOLOGIA E FISIOLOGIA DELLO SVILUPPO E SULLA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI NELLO SPAZIO

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Premessa

Questo articolo è dedicato ad alcuni dei modelli animali, basati su tritone *Pleurodeles waltl*, usati in ricerche di biologia e fisiologia nello spazio, come la biologia dello sviluppo e la rigenerazione dei tessuti in condizioni di microgravità, lo studio di alcuni effetti del volo spaziale sulla biologia e la genetica molecolari durante la rigenerazione, sugli effetti del volo spaziale sulla *deregulation* del sistema immunitario e sull'induzione e determinazione neurali e dell'ipo- iper-gravità sul tessuto emopoietico.

Tre esempi di modelli animali basati su *Pleurodeles waltl* in ricerche di fisiologia, in condizioni normali di gravità, riguardanti il ricupero della locomozione bimodale dopo resezione totale del midollo spinale, la rigenerazione del nervo ottico e della coda amputata, completeranno questa breve rassegna.

Pleurodeles waltl, modello animale nella ricerca spaziale

Anfibi di varie specie sono stati usati in ricerche di biologia spaziale in assenza di gravità, o in microgravità. Tra gli urodeli troviamo *Pleurodeles waltl* (fig. 1) insieme a *Lissotriton vulgaris* e *Cynops pyrrhogaster*. La femmina di *Pleurodeles waltl* trattiene in vita gli spermatozoi, nella cloaca, fino a 5 mesi dopo l'accoppiamento e ciò ne fa un organismo modello ideale per studi di fisiologia ed embriologia in microgravità su un vertebrato (Gualandris-Parisot, 2001; Rosania, 2014). Grazie a questa caratteristica, la femmina può essere inseminata sulla terra e poi fertilizzata durante il volo spaziale, mediante stimolazione ormonale. Un altro vantaggio proprio di questa specie è il suo sviluppo che, essendo molto lento, facilita lo studio degli stadi della sua ontogenesi, dall'oocita alla neurula all'embrione che nuota (girino o larva) (figg. 2,3). Questa peculiarità ha valso a femmine di *Pleurodeles waltl* la partecipazione a ben 8 missioni spaziali. La prima (10/7/1985), a bordo del satellite *Bion 7* (Mitashov, 1990), 10 tritoni erano in compagnia di 2 macachi *rhesus* e 10 ratti. *Bion*

Fig. 1. *Pleurodeles waltl* (da: fotonatura.org)

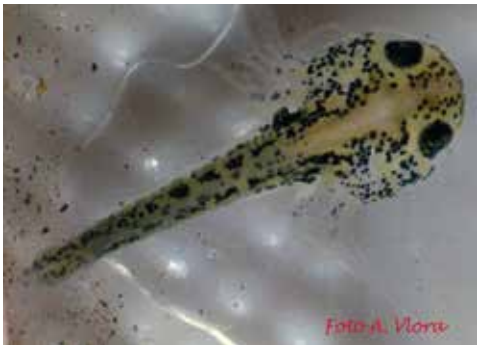


Fig. 2. Larva di *Pleurodeles waltl* di 14 giorni di età (da: Alessandro Flora, "Aquarium" n. 7/8, 1993)

Fig. 3. Larva di *Pleurodeles waltl* di 45 giorni di età (da: Alessandro Flora, "Aquarium" n. 7/8, 1993)

10 (29.12.1992) (Grinfeld, 1004) e *Bion 11* (24gg 12.1996) (fig. 4) (Grigoryan, 2002a) sono i satelliti che hanno ospitato *Pleurodeles waltl* durante altre due missioni spaziali, la cui serie è continuata, sotto controllo francese, sulla stazione spaziale *Mir* (Spedizione Mir Cassiopée) (Dournon, 2001), con studi di follow-up nel 1998 (Spedizione *Mir Pégase*) e nel 1999 (Spedizione *Mir Perseus*). La 7^ spedizione (*Foton-M2*) risale al 20.5.2005 (Domaratskaya, 2006) e l'8^, *Foton-M3* (fig. 5), è durata dal 14.9 al 26.9.2007 (Gualandris-Parisot, 2001; Almeida, 2007). Le missioni senza pilota Foton-M2 e Foton-M3, della durata di 16 e 12 giorni, sono i risultati della collaborazione tra Russia, NASA (USA) e ESA (Agenzia Spaziale Europea) nella realizzazione di esperimenti con lumache (*Helix Lucorn* e *Helix aspera*), tritoni (*Pleurodeles waltl*), gechi (*Pachidactylus turneri*), gerbilli della Mongolia (*Meriones unguiculatus*) e microrganismi (*Streptomyces lividans 66*, *Escherichia coli* e altri).

Tra gli obiettivi degli esperimenti svolti in queste missioni, vi sono stati lo studio degli effetti della microgravità sul comportamento di sistemi viventi, sulla loro struttura e fisiologia, sulla rigenerazione post-traumatica di ossa e organi, sull'ereditarietà stabile del plasmide pIJ 702, promotore del gene della tirosina chinasi e sulla sintesi di melanina da parte di streptomiceti (Ilyin, 2013).

Le ricerche condotte nello spazio, che più ci interessano in questa sede, vertevano sulla capacità di *Pleurodeles waltl* di rigenerare tessuti danneggiati - risultata più veloce nello spazio e 2 volte più rapida negli stadi precoci di sviluppo (Grigoryan, 2002b) - e le fasi dello sviluppo e della riproduzione nello spazio (Dournon, 1985). Sono stati fatti anche studi in ipergravità (fino a 3G) sulla terra riguardanti la fertilizzazione di *Pleurodeles waltl* (Aimar, 2000) e la fertilità dei tritoni nati durante la spedizione spaziale, risultati fertili e privi di alterazioni comportamentali (Dournon, 2001). Questo tritone è un modello animale unico per studi sulla rigenerazione dei tessuti danneggiati: rigenera zampe amputate e tessuti lesionati dell'occhio, del cervello, del midollo spinale, dell'intestino e del cuore. Gli studi sui meccanismi genetici alla base della rigenerazione sono stati a lungo ostacolati dalle difficoltà incontrate nell'allevamento in cattività di questa e altre specie di tritoni. Messe a punto le condizioni di allevamento ideali, *Pleurodeles waltl* è risultato la specie ideale in questo tipo di ricerca, anche perché depone, durante tutto l'anno, fino a 150 uova fertilizzate/2 settimane.

Studi recenti hanno messo a punto metodi per l'inseminazione artificiale e la transgenesi per migliorare e incrementare l'uso di questa specie in studi di genetica molecolare (Rosania, 2014). Ricerche istologiche e ultrastrutturali hanno evidenziato tre diversi tipi di ghiandole multicellulari nella cute di *Pleurodeles waltl*: le ghiandole del muco - piccole, dotate di

uno strato di cellule secretorie che tappezzano un lume centrale, producono un film mucoso, viscoso e viscido, che ha varie funzioni in questo come in altri anfibi - e le ghiandole sierose, suddivisibili in 2 gruppi in base alle caratteristiche istologiche e ultrastrutturali: le ghiandole granulari di Tipo I (GGI) e le ghiandole granulari di Tipo II (GGII). Le GGI, di dimensioni modeste, distribuite su tutta la superficie corporea, sono più fittamente concentrate nella cute del capo, dietro gli occhi, e del dorso; le GGII, invece, sono molto grandi e si trovano solo nella cute della coda, con maggior densità nel dorso. Le ghiandole granulari dei due tipi contengono soprattutto materiali proteici, ma differiscono tra loro per aspetti morfologici come forma, dimensioni, organizzazione cellulare e per la distribuzione, le dimensioni e la forma delle vescicole. Ambedue i tipi ghiandolari sono concentrati soprattutto nelle parti del corpo più esposte all'attacco dei predatori e si pensa che producano sostanze repellenti/velenose per difendersi da potenziali aggressori (Heiss, 2009).

Ricerche sulla biologia dello sviluppo in condizioni di microgravità

Gli unici anfibi urodeli che hanno partecipato a esperimenti realizzati durante missioni spaziali sono due *Salamandridae*: *Cynops pyrrhogaster* e *Pleurodeles waltl*. I vantaggi dell'uso di urodeli in questa tipologia di esperimenti consistono nella riproduzione: come abbiamo già visto, alcuni mesi dopo l'accoppiamento naturale, 1) le femmine di *Pleurodeles waltl*, fertilizzate con trattamento ormonale, depositano uova fecondate in assenza del maschio, perché dopo l'accoppiamento conservano a lungo gli spermatozoi nelle ghiandole pelviche della cloaca; 2) in queste due specie di urodeli, il ritmo dello sviluppo è più lento che nell'anuro *Xenopus,* e 3) le caratteristiche fisiologiche permettono a questi anfibi di vivere in un contenitore d'acqua chiuso, o in un ambiente umidificato, e di digiunare per vari giorni. Inoltre, gli urodeli rivestono un importante interesse filogenetico: differiscono dagli anuri in molti fenomeni biologici, come gli eventi della fertilizzazione, l'origine delle cellule germinali, la loro migrazione verso le gonadi in differenziamento e la capacità di rigenerare tessuti e organi danneggiati.

Il principale obiettivo degli esperimenti spaziali nei quali tritoni di queste due specie sono stati coinvolti era rispondere ai seguenti interrogativi: 1) la fertilizzazione delle uova si realizza normalmente in condizioni di microgravità? 2) il successivo sviluppo embrionale è normale in microgravità? 3) sviluppo e capacità riproduttiva sono normali dopo il ritorno sulla terra? 4) la microgravità incide sullo sviluppo e sulla fisiologia degli organi nell'animale adulto? 5) la microgravità influenza la rigenerazione di tessuti e organi danneggiati?

Mentre è stato chiaramente dimostrato che la fertilizzazione nello spazio avviene regolarmente, il successivo sviluppo embrionale in microgravità è risultato alterato in modo evidente: si sono osservate, negli embrioni nati durante il volo spaziale, anomalie quali movimenti citoplasmatici corticali, diminuita adesione cellulare e perdita di cellule. Tuttavia, sebbene le fasi precoci dello sviluppo non fossero strettamente normali a causa dei fenomeni di regolazione embrionale alterati, le giovani larve alla schiusa delle uova presentavano fenotipi normali e normale comportamento natatorio. Al termine della missione, e durante lo sviluppo embrionale fino all'età adulta, non si sono osservate differenze comportamentali tra i tritoni nati nello spazio e quelli nati sulla terra. Inoltre, gli esami effettuali sulle loro progenie non hanno evidenziato differenze caratteristiche tra i Pleurodeli della missione spaziale e quelli di controllo: le percentuali di fertilizzazione e di sviluppo dei primi erano in linea con quelle degli animali di controllo; durante l'analisi della prole non sono state rilevate anomalie genetiche e lo sviluppo delle loro progenie non ha manifestato differenze caratteristiche rispetto ai Pleurodeli rimasti sulla terra. Tuttavia, va detto che in vari esperimenti, soprattutto nei primi, il numero dei tritoni adulti arruolati era basso, tanto da non permettere di trarre

Fig. 4. Satellite artificiale Bion 11: nel modulo sferico centrale erano alloggiate femmine di *Pleurodeles waltl*, lumache, drosofile, batteri e Lapik e Mutik (scimmie della specie *Macaca mulatta*) (missione spaziale russa del 1996)

conclusioni definitive sugli effetti specifici della microgravità. Inoltre, in certe missioni spaziali, la termostatazione non era ben regolata e, durante la permanenza nello spazio, si sono verificati innalzamenti della temperatura. Le condizioni nelle quali si sono svolte queste missioni spaziali hanno influenzato sicuramente i campioni biologici e, quindi, anche i risultati e la loro interpretazione. Il volo e la permanenza nello spazio hanno indotto evidenti effetti sulla rigenerazione di organi e tessuti ma, più specificamente, hanno prodotto effetti a lungo termine, durati varie settimane dopo il ritorno degli animali sulla terra. Un risultato di questo tipo è stato ottenuto per gli otoconia[1] parecchi mesi dopo l'atterraggio: l'esperimento Torcol, che viaggiò sul volo Perseo alla stazione spaziale MIR (20.2.1999 – 28.8.1999) sul "taxi" Soyuz, dimostrò che, dopo un lungo viaggio nello spazio, sia gli otoconia di cristalli di calcite che quelli di aragonite erano alterati in Pleurodeli adulti (Dournon, 2003). Finora non sono state formulate ipotesi definitive sull'interpretazione di queste osservazioni.

Ricerche sulla rigenerazione dei tessuti nello spazio

La rigenerazione dei tessuti negli urodeli è un importante e ben consolidato modello sperimentale per lo studio degli effetti di fattori spaziali, quali microgravità e radiazioni, sulla sopravvivenza di lungo termine di organismi viventi nello spazio.

Sedici *Pleurodeles waltl*, ai quali erano stati asportati chirurgicamente i cristallini, un piede e la punta della coda, hanno partecipato alla missione spaziale *Foton-M3* della durata di 12 giorni (2007), allo scopo di sottoporre a test nuovi approcci tecnici per validare esperimenti sulla rigenerazione di tessuti lesionati nello spazio. In particolare, la ricerca verteva sulla rige-

nerazione del cristallino, degli arti e della coda, con particolare riguardo al controllo della proliferazione cellulare, dell'apoptosi, della morfologia e dei fattori di crescita. I risultati ottenuti da questi tritoni al ritorno dalla missione spaziale sono stati confrontati con controlli sincroni (gravità terrestre: G=1) e due controlli allevati in acquario (in ipogravità). I progressi della rigenerazione tissutale sono stati confrontati con quelli dei controlli basali operati 10 giorni prima del lancio. Durante gli esperimenti sui tritoni operati orbitanti su *Foton-M3* e quelli di controllo sincrono, sono state effettuate registrazioni video e monitorate temperatura, radiazioni e incorporazione di BrdU (5-bromo-2-desossiuridina), analogo strutturale della timidina e marker di neosintesi di DNA, usato per valutare la proliferazione cellulare avvenuta durante la permanenza nello spazio. A fine missione, sono stati eseguiti il conteggio differenziale delle cellule del sangue (neutrofili, eosinofili, basofili, linfociti e monociti) e l'esame istologico del fegato. La rigenerazione del cristallino dei tritoni che avevano partecipato al volo nello spazio è risultata più uniforme di quella dei controlli sincroni e più avanzata di 0,5-1 stadio. In ambedue i gruppi sperimentali, la rigenerazione del cristallino è stata accompagnata dalla crescita della popolazione di cellule gliali radiali della retina e da un aumento dell'espressione tissutale della *stress protein* HSP90[2]. Nella zona di crescita degli occhi in rigenerazione, l'espressione di FGFβ, citochina chiave nella rigenerazione del cristallino, è aumentata simultaneamente all'attività mitotica cellulare nel cristallino rigenerante ed è risultata maggiore nei tritoni del volo spaziale *vs* i tritoni del controllo sincrono. La rigenerazione del piede amputato dell'arto anteriore è progredita fino a uno stadio iniziale di guarigione di pari entità nei due gruppi sperimentali, nei quali non si potevano, comunque, rilevare segni specifici di rigenerazione del piede. Anche il grado di rigenerazione della coda, giunta allo stadio IV-V e l'area rigenerata della coda, non differivano nei due gruppi, mentre la lunghezza della parte di coda rigenerata era ridotta nei tritoni che avevano partecipato al volo spaziale, rispetto a quella del controllo sincrono. Cambiamenti rilevanti nella morfologia della punta della coda sono stati rilevati tra i controlli sincroni, gli animali che avevano volato nello spazio e quelli che avevano nuotato negli acquari. L'analisi morfometrica computerizzata ha mostrato che

Fig. 5. Foton-M3: satellite russo con carico utile di 400 kg, fornito dall'Agenzia Spaziale Europea, lanciato nello spazio dal vettore Soyuz-U (2007). Tra i 43 esperimenti programmati, alcuni avevano come *test system Pleurodeles waltl* in ricerche sulla rigenerazione del cristalino e della zampa e coda amputate.

la forma delle parti rigenerate della coda dei tritoni cha avevano partecipato al volo spaziale era identica a quella dei controlli dell'acquario, mentre i controlli sincroni avevano sviluppato una netta asimmetria dorso-ventrale.

Questi risultati, insieme ai dati prodotti dalle missioni spaziali precedenti, fanno pensare che la rigenerazione dei tessuti, negli urodeli esposti alle sollecitazioni del viaggio spaziale, sia alterata in modo tessuto-specifico e che possa risultare in una crescita tissutale rigenerativa e in un differenziamento anormalmente rapido, o lento (Almeida, 2007)

Ricerche sulla biologia e sulla genetica molecolare durante la rigenerazione nello spazio

La DNA polimerasi μ (Polμ) è implicata nella riparazione del DNA, nella ricombinazione V(D)J[3] (le sequenze VDJ vanno a formare la parte variabile delle immunoglobuline) e, probabilmente, nell'ipermutazione somatica[4] dei geni dell'immunoglobulina.

Le condizioni che si realizzano durante un volo spaziale condizionano l'espressione del gene che codifica per l'immunoglobulina e la frequenza delle ipermutazioni somatiche. Per chiarire se anche l'espressione di Polμ risulta condizionata durante il volo spaziale, è stata caratterizzata la polimerasi di *Pleurodeles waltl* e gli embrioni di questa specie sono stati esposti alle condizioni estreme di un volo spaziale o a modifiche ambientali corrispondenti a quelle incontrate sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS (fig. 6), orbitante tra i 330 e i 435 km di altitudine, alla velocità di 27.600 km/h, completa 15,5 orbite/giorno). E' stata notata una forte espressione della Polμ mRNA durante i primi stadi dell'ontogenesi e nei testicoli, facendo pensare che Polμ sia coinvolta nella stabilità del genoma. I trascritti Polμ a lunghezza intera erano 8-9 volte più abbondanti in *Pleurodeles waltl* che nell'uomo e nel topo, fornendo una spiegazione per la predilezione dell'ipermutazione somatica delle basi azotate citosina (pirimidinica) e guanina (purinica) nel DNA degli anfibi. La trascrizione di Polμ è diminuita dopo 10 giorni di sviluppo nello spazio e le radiazioni sono sembrate particolarmente coinvolte in questa *down-regulation*. Tuttavia, le radiazioni spaziali, da sole o in combinazione con una perturbazione del ritmo circadiano, non hanno influenzato i livelli della proteina Polμ e non hanno indotto l'osssidazione delle proteine, dimostrando che le radiazioni incontrate durante la permanenza di 10 giorni nella ISS hanno avuto un impatto limitato (Schenten, 2013).

La rigenerazione di un tessuto danneggiato o perso è un evento rilevante. Sebbene gli studi sulla rigenerazione nel tritone abbiano una storia ormai più che secolare, la funzione genica alla base della regolazione della rigenerazione è per lo più ancora da chiarire. L'analisi di animali knockout è uno strumento potente che permette di chiarire le funzioni dei geni.

Recentemente, sono state messe a punto le *transcription activator-like effector nucleases*[5] (TALEN) come tecnica efficace per *genome editing*[6]. Le TALEN rendono possibile la distruzione mirata di un gene e si sono mostrate efficienti in vari modelli animali, permettendo il *gene targeting* anche in anfibi come i tritoni, cosa del tutto impossibile nel passato. Embrioni di *Pleurodeles waltl* allo stadio di singola cellula, microiniettati con TALEN mRNA progettato per il *targeting* del gene tirosinasi (controlla la sintesi di melanina), hanno manifestato un fenotipo albino. L'analisi della sequenza genica ha dimostrato che i geni della tirosinasi erano stati effettivamente disgregati nei tritoni albini. Inoltre, si sono ottenute altre alterazioni precise del genoma usando le TALEN e oligodesossinucleotidi a singolo filamento. In conclusione. le TALEN si sono rivelate strumenti efficaci e potenti per il *genome editing* nella ricerca rigenerativa nel tritone (Hayashi, 2014).

L'analisi genetica è uno strumento efficace e potente per chiarire le funzioni geniche coinvolte nella rigenerazione: è quindi importante costruire linee transgeniche o *knockout* e incrociarle per studiare le funzioni di singoli geni. Questo approccio sperimentale, da tempo in uso in vari modelli di vertebrati, non è ancora un modello sperimentale di genetica mole-

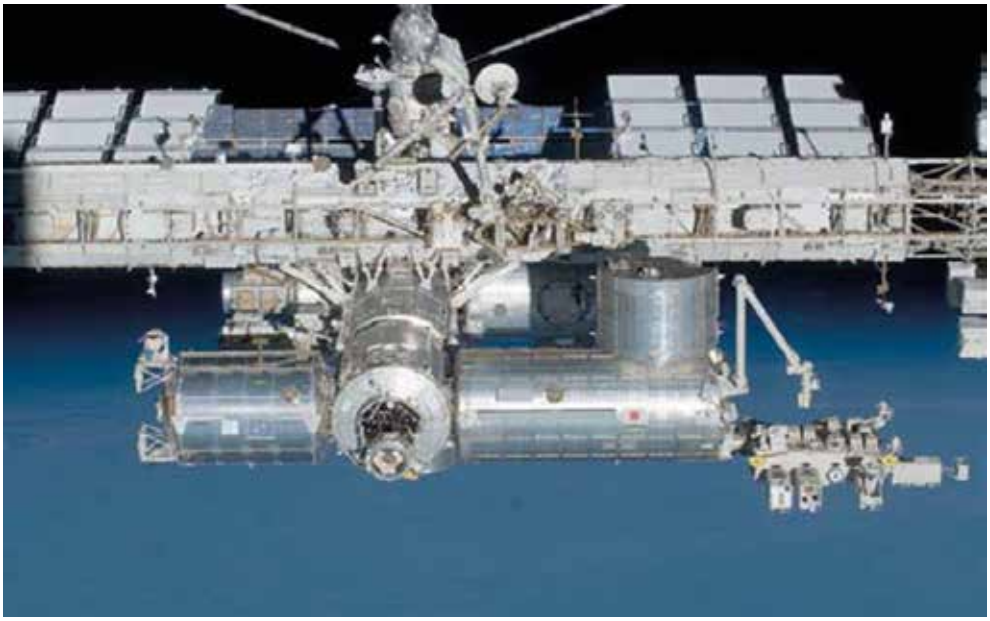


Fig. 6. Stazione spaziale internazionale (ISS, in orbita a 330-435 km dalla terra, velocità 27.600 km/h, 15,5 orbite/giorno). Tra gli esperimenti programmati a bordo della ISS, uno riguardava lo studio dell'impatto del volo spaziale (microgravità) sulla produzione di anticorpi in larve di *Pleurodeles waltl*. All'atterraggio, l'mRNA delle IgM delle larve esposte alla microgravità era doppio di quello delle larve rimaste a terra, dimostrando che i cambiamenti di gravità durante lo sviluppo pregiudicano la produzione di anticorpi e la rigenerazione dei globuli bianchi, ma non alterano lo sviluppo delle larve e non creano processi infiammatori.

colare da usarsi nella routine della ricerca sulla rigenerazione dei tessuti nel tritone, a causa delle difficoltà incontrate, fino a poco tempo fa, nell'allevamento di questi anfibi in cattività. *Pleurodeles waltl* possiede proprietà eccezionali come modello animale: sono state messe a punto condizioni che permettono di ottenere uova in numero e di qualità sufficienti durante tutto l'anno e si è abbassato, da 18 a 6 mesi, il periodo necessario per raggiungere la maturità sessuale in questa specie. Inoltre, è stato dimostrato che la capacità di *Pleurodeles waltl* di rigenerare vari tessuti danneggiati o amputati è pari a quella di *Cynops pyrrhogaster* ("tritone dal ventre di fuoco", tritone comune giapponese), altro urodelo usato in studi sulla rigenerazione. Infine è stato messo a punto un metodo efficiente di transgenesi.

Col ricorso a queste tecnologie è stato è stato dimostrato che *Pleurodeles waltl* è modello animale idoneo ad approcci di genetica molecolare in ricerche sulla rigenerazione tissutale, che renderà possibili studi comparativi usando come *test system* il tritone e altri modelli di vertebrati (Hayashi, 2013).

Ricerche sulla *deregulation* del sistema immunitario associata al volo nello spazo

Il sistema immunitario va incontro a una *deregulation* durante, e immediatamente dopo, un volo nello spazio. Sono molti i modelli animali usati per studiare questo fenomeno a causa 1)

della limitata disponibilità di soggetti umani coinvolti nei voli spaziali e 2) della necessità di effettuare esperimenti che richiedono prelievi di campioni e implicano condizioni sperimentali che sono incompatibili con il coinvolgimento di soggetti umani.

Pleurodeles waltl condivide con l'uomo gli elementi primari del sistema immunitario adattativo e ciò rende questa specie particolarmente adatta per studi sull'immunità. Anche il sistema immunitario di questo anfibio, durante e subito dopo un volo spaziale, va incontro a un processo di *deregulation* che può comprometterne le difese immunitarie contro i patogeni.

Sono state studiate le principali alterazioni indotte dal volo spaziale su agenti patogeni e sul sistema immunitario di *Pleurodeles waltl* e sono stati messi a punto *hardware* sviluppati per ospitare questi anfibi nelle stazioni spaziali. I risultati mostrano che questo tritone soddisfa molti dei requisiti connessi alla sperimentazione spaziale e che questo modello animale è uno strumento interessante per ampliare e approfondire la nostra comprensione degli effetti immunosoppressivi indotti dal volo spaziale, tappa necessaria per affrontare future missioni spaziali a maggiori distanze dalla terra e di più lunga durata (Frippiat, 2013).

Le condizioni nelle quali si svolgono i voli spaziali condizionano la produzione di anticorpi in risposta a una stimolazione antigenica negli anfibi adulti. Per appurare se la sintesi di anticorpi è condizionata quando lo sviluppo di *Pseurodels waltl* avviene a bordo della stazione spaziale, embrioni di tritone sono stati spediti sulla ISS prima che iniziasse l'espressione della catena pesante delle immunoglobuline (IgM). Al ritorno sulla terra, sono stati determinati gli effetti del volo spaziale sullo sviluppo di *Pleurodeles waltl* e sulla trascrizione della catena pesante delle IgM in confronto a embrioni sviluppati sulla terra: la trascrizione della catena pesante è raddoppiata nello spazio, mentre lo sviluppo non ne ha risentito e non ha indotto fenomeni infiammatori. Inoltre sono state ricreate, in laboratorio, le condizioni ambientali alterate cui erano andati incontro gli embrioni in fase di sviluppo durante il volo nello spazio e il soggiorno nell'ISS: è stato così possibile dimostrare che i cambiamenti di gravità sono il fattore responsabile delle modifiche della trascrizione della catena pesante delle IgM, modifiche associate alle variazioni dei livelli di NF-kB^7 mRNA. Questi risultati, insieme al fatto che queste larve non erano immunizzate, fanno pensare a probabili modifiche della linfopoiesi causate dai cambiamenti gravitazionali durante l'ontogenesi (Huin-Schohn, 2013).

Ricerche sugli effetti dell'ipergravità sul tessuto emopoietico di *Pleurodeles waltl*

La gravità è un importante fattore nel produrre carichi meccanici biologicamente rilevanti e organismi viventi devono affrontare condizioni di microgravità e di ipergravità che si verificano durante le missioni spaziali. Gli effetti dell'ipergravità sul tessuto emopoietico di *Pleurodeles waltl* sono stati studiati in parallelo a esperimenti di rigenerazione tissutale del cristallino e della coda (volo di 16 giorni a bordo di Foton-M2). Al 9° giorno dopo l'intervento chirurgico, un gruppo di tritoni è stato sottoposto, per 12 giorni, a una centrifugazione di 2G, mentre un altro gruppo era mantenuto a 1G. Inoltre, c'erano un controllo basale 1G su stuoie bagnate (CB, 1G) e un controllo sincrono in galleggiamento neutro, in acquario (CA, bassa gravità). In tutti i gruppi sperimentali, e nei controlli, sono stati effettuati controlli ematici differenziali ed esami istologici della milza e del fegato. Ventun giorni dopo l'intervento chirurgico, in tutti i gruppi (CA, 1G e 2G), il numero dei neutrofili nel sangue era significativamente più basso che in CB, indicando un calo dell'infiammazione causata dall'intervento chirurgico. Tuttavia, nel gruppo 2G il numero dei neutrofili era significativamente maggiore che in CA: questo risultato induce a pensare che l'infiammazione post-operatoria possa persistere più a lungo a 2G che nelle condizioni senza carico dell'acquario. Al contrario, non sono state osservate differenze significative nel numero dei linfociti tra i gruppi sperimentali e *vs* i gruppi di controllo. L'esame istologico di milza e fegato non ha evidenziato alterazioni morfologiche significative ascrivibili all'ipergravità. Questi risultati indicano che 12 giorni

di esposizione a un'ipergravità di 2G ha solo un effetto parziale sull'emopoiesi di *Pleurodeles waltl*, forse prolungando la durata delle risposte indotte dall'operazione chirurgica. Dati ottenuti in esperimenti effettuati con questo tritone, durante le missioni spaziali Foton-M2 e Foton-M3 in microgravità, hanno mostrato che, anche in queste occasioni, gli effetti sulle cellule del sangue sono stati molto modesti. Inoltre, condizioni di microgravità non hanno indotto alcuna alterazione nei tessuti emopoietici e linfoidi, né hanno danneggiato la capacità proliferativa delle cellule emopoietiche.

Concludendo, il sistema emopoietico di *Pleurodeles waltl* possiede solo una limitata sensibilità alla gamma di situazioni che si verificano in condizioni di gravità alterata. Probabilmente, questo fatto rispecchia il preadattamento degli anfibi a variazioni del livello di gravità, sia sulla terra a 1G, che in acqua in condizioni di scarico parziale (Domaratskaya, 2012).

Note

Nota 1. Gli otoconia sono granelli, spesso sferici, di 1-50 μm; si trovano nel sacculo (letto di cellule sensoriali nell'orecchio interno) o nell'utricolo (con il sacculo, è uno dei due organi otoliti nell'orecchio interno dei vertebrati, più precisamente nel labirinto vestibolare). Sono sensibili alla gravità e all'accelerazione lineare. A causa del loro orientamento nel capo, l'utricolo è sensibile ai cambiamenti nei movimenti orizzontali e il sacculo fornisce informazioni sull'accelerazione verticale. Questi cristalliti sono essenziali per l'orientamento e l'equilibrio.

Nota 2. HSP90 è una proteina da shock termico (massa molecolare di circa 90 kDa) presente nelle cellule eucariote, nelle quali svolge un ruolo essenziale per quanto riguarda il ripiegamento e l'attivazione di un determinato *network* di proteine, oltre a esercitare un'azione di protezione e contrasto dell'effetto denaturante del calore, qualora le condizioni ambientali lo richiedano.

Nota 3. La ricombinazione V(D)J è uno speciale processo di riarrangiamento genico che dà origine ai geni codificanti per i recettori dell'antigene nei linfociti B e linfociti T, durante la loro maturazione rispettivamente nel midollo osseo e nel timo. È così chiamata perché vengono resi contigui segmenti genici V, D e J scelti casualmente. Questo processo è responsabile della diversificazione dei recettori per l'antigene dei linfociti B e dei linfociti T.

Nota 4. L'ipermutazione somatica è un processo utilizzato dai linfociti B per generare anticorpi. Il sistema immunitario è molto adattato a generare un'enorme diversità di anticorpi contro migliaia di patogeni, usando un set limitato di geni presenti nel genoma. Si tratta di un processo addizionale, enzimatico critico, che aggiunge mutazioni puntiformi nelle regioni V delle catene delle Ig. L'ipermutazione somatica avviene quando le Ig rispondono a un antigene. In generale ci sono degli *hot spots* dove le mutazioni avvengono preferenzialmente. Le cellule B sono poi selezionate a seconda dell'affinità delle Ig che producono (che dipende dalle mutazioni che sono avvenute). E' il processo chiave responsabile della generazione della diversità anticorpale dentro le cellule B. Molte delle mutazioni non sono funzionali, si tratta di un processo casuale, poi la selezione fa il resto.

Nota 5. Le *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) emerse di recente come uno strumento di *gene editing* (vedi Nota 6) in molti differenti organismi e tipi cellulari. Si tratta di enzimi di trascrizione artificiali generati dalla fusione di un *TAL effector DNA binding domaine* a un *DNA cleavage binding domaine*. I *breack* sito-specifici cromosomici a doppio filamento introdotti dalle TALEN aumentano significativamente l'efficienza delle modifiche genomiche.

Nota 6. *Genome editing*, o *genome editing with engineered nucleases*, è una tipologia di *genetic engineering* che permette di inserire, rimpiazzare/rimuovere DNA in/da un genoma, usando nucleasi artificialmente ingegnerizzate, o "forbici molecolari" (TALEN, vedi Nota 5), che creano specifici *break* a doppia elica nei punti desiderati del genoma e guidano il meccanismo endogeno della cellula nella riparazione del *break* indotto, per mezzo di processi naturali di ricombinazione omologa e di *non homologous end-joining*.

Nota 7. NF-kB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) è un fattore di trascrizione che svolge un ruolo primario nella regolazione della risposta immunitaria, nell'infiammazione, nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi.

Bibliografia

- Aimar, C., et al., 2000; Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander Pleurodeles waltl (urodele amphibian). Biol Reprod., vol. 63: pp. 551-558
- Almeida, E., 2007; Spaceflight Effects on Regeneration in Lower Vertebrates: Molecular-Biology and Cytochemistry Examinations (Regeneration-F3). National Aeronautics and Space Administration (NASA) Center, Ames Research Center
- Domaratskaya, E., et al., 2006; Studies on hemopoietic tissue of ribbed newt, Pleurodeles waltl after the flight on board Russian satellite "Foton- M2" in 2005. 36th COSPAR Scientific Assembly. Held 16 - 23 July 2006, in Beijing, China. Meeting abstract from the CDROM, #654
- Domaratskaya, E., 2012; Analysis of the hematopietic tissue in Pleurodeles waltl newts exposed to 2g hypergravity. 39th COSPAR Scientific Assembly, Held 14-22 July 2012, in Mysore, India. Abs D3.2-11-12, p. 463
- Dournon, C., and Houillon, C., 1985; Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'Amphibien Urodèle, *Pleurodeles waltlii*. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. Reproduction Nutrition Développement, vol. 25: pp. 671-688
- Dournon, C., et al., 2001; Effects of microgravity on the larval development, metamorpho-

sis and reproduction of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Development, Growth & Differentiation, vol. 43; pp. 315-326
- Dournon, C., 2003; Developmental biology of urodeles anìmphibians in microgravity conditions. Adv. Space Biol. Med., vol. 9: pp. 101-131
- Frippiat, J. P., 2013; Contribution of the urodele amphibian Pleurodeles waltl to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. Mol. Immunol., vol. 56: pp.434-441
- Grigoryan, E. N, et al., 2002a; Urodelean amphibians in studies on microgravity: effects upon organ and tissue regeneration. Advances in Space Research, vol. 30: pp. 757-764
- Grigoryan, E. N., et al., 2002b, Urodelean amphibians in studies on microgravity: effects upon organ and tissue regeneration. Advances in Space Research, vol. 30: pp. 757-764
- Grinfeld, S., et al., 1994; Tissue regeneration in space (spinal cord, muscle and bone) in the amphibian *Pleurodeles waltl*. Life Sciences Research in Space, ESA SP-366. European Space Agency, pp.181-184
- Gualandris-Parisot L, et al., 2001; *Pleurodeles waltl*, amphibian, Urodele, is a suitable biological model for embryological and physiological space experiments on a vertebrate. Adv. Space Res., vol. 28: pp. 569-78
- Hayashi, t., et al., 2013; Molecular genetic system for regenarative studies using newts. Development, Grovth & Differentiation, vol. 55: pp. 229-236
- Hayashi, T., et al., 2014; Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (PLeurodeles waltl), an experimental model of animal regeneration. Dev. Growth Differ., vol. 56: pp. 115-121
- Heiss, E., et al., 2009; Three types of cutaneous glands in the shìkin of the salamandrid-Pleurodeles waltl. A histological and structural study. J. Morphol., vol. 270: pp. 892-902
- Huin-Schohn, C., et al., 2013; Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. FASEB J., vol. 27: pp. 333-341
- Ilyin, E. A., 2013; Biological experiments in flights of unmanned space craft Foton-M2 and Foton-M3. Aviakosm. Ekolog. Med., vol. 47: pp. 47-54
- Mitashov, V. I., et al., 1990; Lens and limb regeneration in newt during and after 13-day long spaceflight. *ESA, Microgravity as a Tool in Developmental Biology p 85-92 (SEE N 90-25239 19-29)* (1990)
- Rosania, K., 2014; Newts with superpowers. Laboratory Animal Europe, vol. 14: p. 34
- Schenten, V., et al., 2013; Modulation of Pleurodeles waltl DNA Polymerase mu Expression by Extreme Conditions encountered during Spaceflight. PloS One 8, e69647, DOI: 10.137

IL TRITONE *PLEURODELES WALTL*, MODELLO ANIMALE PER RICERCHE SU INDUZIONE E DETERMINAZIONE NEURALI, SUL RICUPERO DELLA LOCOMOZIONE BIMODALE E SULLA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI DANNEGGIATI

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Pleurodeles waltl, modello in ricerche sui meccanismi che presiedono all'induzione e alla determinazione neurali

La neurulazione è un processo dell'organogenesi, per il quale dallo stadio di gastrula si passa a quello di neurula: nella regione dorsale dell'embrione, si differenzia una striscia di cellule che costituisce la piastra neurale, dalla quale si sollevano due pieghe longitudinali che si saldano a formare il tubo neurale; da questo avrà poi origine l'encefalo. La neurulazione inizia con l'induzione neurale (fig. 1), fase durante lo sviluppo embrionale di un vertebrato nella quale il cordomesoderma[1] interagisce con l'ectoderma, influenzandone il differenziamento in senso neurale. Grazie a questo processo, le cellule acquisiscono un'identità neurale ed ha inizio la formazione del tubo neurale, detta neurulazione (fig. 1). Nei vertebrati, l'abbozzo della piastre neurale da una area dell'ectoderma primitivo è accompagnato dalla comparsa dell'espressione di un gene specifico che, a sua volta, promuove la formazione del sistema nervoso.

Studi comparativi e complementari sulla determinazione neurale sono stati fatti in anfibi urodeli (*Pleurodeles*) e anuri (*Xenopus*). Gli urodeli hanno un sistema embrionale ideale per lo studio degli eventi iniziali dell'ontogenesi, che presenta diversi vantaggi rispetto ad altri modelli: 1) allo stadio iniziale di gastrula, lo *Spemann-Mangold Organizer*[2], cioè l'area cordale e mesodermale, ha una localizzazione esterna senza alcun contatto con l'ectoderma sottostante; 2) lo sviluppo embrionale è lento; 3) le cellule sono di grandi dimensioni, tali da permettere di seguire facilmente nei dettagli molti aspetti di processi cellulari, molecolari e ionici *in vitro* e *in vivo*; 4) uova ed embrioni sono diploidi, un vantaggio nei confronti di *Xenopus*.

Di particolare interesse è la neurogenesi, processo di formazione di nuove cellule nervose da cellule staminali neurali o da cellule progenitrici. La determinazione di due linee neurali, neuronale e astrogliale, compare durante la gastrulazione, come conseguenza di uno o più eventi permissivi attivati attraverso una *pathway* di trasduzione Ca^{++}-dipendente, che coinvolge canali del calcio di tipo L[3] (*long lasting*). L'attivazione di questa via Ca-dipendente è sufficiente ad attivare geni strutturali specifici, sia neurali che gliali, attraverso l'attivazione

Pleurodeles waltl adulto (da: flickr.com)

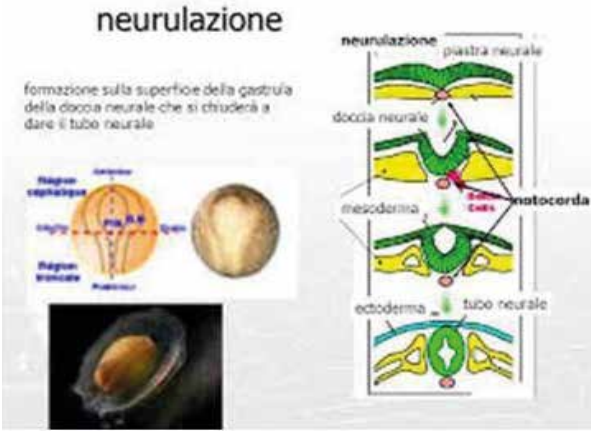


Fig. 1. Induzione neurale. Il cordomesoderma interagisce con l'ectoderma, influenzandone il differenziamento in senso neurale, con formazione della piastra neurale. La neurulazione è il processo che porta dalla gastrula alla neurula: dalla piastra neurale, si forma la doccia neurale e da questa il tubo neurale, dal quale si svilupperà l'encefalo. (da: slideplayer.it)

diretta di "*immediate early gene*[4]". Le caratteristiche specifiche del differenziamento della funzione neurale dipendono da fattori addizionali di origine cordo-mesodermica, che agiscono durante e dopo la gastrulazione. Allo stadio di neurula iniziale, il 20% delle cellule progenitrici nella piastra neurale presenta un destino neurale, mentre l'80% è costituito da cellule bipotenziali, che generano cloni misti (neuroni e astrogliociti) (Duprat, 1996).

Pleurodeles waltl modello in ricerche sul ricupero della locomozione bimodale dopo resezione totale del midollo spinale

L'analisi elettromiografica (EMG) è stata usata per valutare il recupero funzionale della locomozione bimodale in *Pleurodeles waltl* adulti, con resezione trasversale completa del midollo spinale. Le registrazioni EMG sono state effettuate durante il nuoto e il cammino sul terreno nello stesso animale, prima e varie volte (fino a 500 giorni) dopo la spinalizzazione effettuata a metà tronco. Due-tre settimane dopo la spinalizzazione, l'attività EMG locomotoria era limitata alle zampe anteriori e alla parte rostrale del corpo, rispetto alla resezione del midollo. In seguito, c'è stato un ritorno dell'attività EMG locomotoria che ha interessato livelli progressivamente più caudali rispetto la transezione (sezione trasversale completa) midollare, fino al raggiungimento del ricupero di un profilo locomotorio stabile 3-4 mesi dopo la transezione. Vari parametri della locomozione (durata del ciclo, durata e proporzione del periodo di paralisi degli arti inferiori, fase di latenza intersegmentale, coordinazione tra gli arti) sono stati misurati a intervalli diversi del tempo di ricupero dopo la spinalizzazione e confrontati con i tempi corrispondenti degli animali integri. Il confronto ha evidenziato alterazioni dei parametri della locomozione transienti e di lungo termine, sia a monte che a valle del taglio di transezione. Queste alterazioni erano molto più pronunciate nel nuoto che nella deambulazione sul terreno e hanno evidenziato differenze nella plasticità adattativa tra i due sistemi di locomozione. L'attività locomotoria ricuperata è stata immediatamente e completamente abolita dalla ri-transezione portata al sito della spinalizzazione originale, suggerendo che il midollo spinale caudale, dopo la prima transezione, era stato re-innervato da assoni discendenti dal cervello o da assoni di neuroni propriospinali[5] e che questa rigenerazione ha contribuito al ripristino dell'attività locomotoria. Studi di anatomia condotti in parallelo hanno ulteriormente dimostrato che alcuni degli assoni rigenerati provenivano da cellule immu-

noreattive glutammatergiche e serotoninergiche localizzate nella formazione reticolare[6] (via reticolospinale) (Chevallier, 2004).

Pleurodeles waltl modello di ricerca sulla rigenerazione del nervo ottico

La ricrescita assonale spontanea, dopo una lesione del SNC, si verifica in anfibi e pesci, non nei mammiferi. Forse questa differenza di capacità rigenerativa è dovuta all'assenza, nel SNC di pesci e anfibi, di molecole che inibiscono la crescita neuronale, che sono presenti, invece, nel SNC dei mammiferi. Una spiegazione alternativa del perché negli anamnioti si realizzi la rigenerazione è che queste molecole inibitrici, presenti anche nel loro cervello, siano immediatamente rimosse subito dopo la lesione.

Sono state studiate l'espressione e la funzione di tenascina-R in *Pleurodeles waltl*. Tenascina-R è una molecola multi-dominio e multifunzionale della matrice extracellulare, espressa esclusivamente nel SNC dagli oligodendrociti e da una sotto-popolazione di neuroni, con funzioni inibitorie della crescita dei neuriti. Nonostante che, negli anfibi, il nervo ottico possa rigenerarsi spontaneamente, questa molecola compare in concomitanza con la mielinizzazione, durante la metamorfosi, ed è presente nel nervo ottico di *Pleurodeles waltl*, come dimostrato con *immunoblot* e immunoistochimica. Gli assoni delle cellule del ganglio retinico non sono capaci di crescere *in vitro,* da espianti retinici, su un substrato di tenascina-R, o di attraversare un sottile confine di substrato di tenascina-R in presenza di laminina, indicando che tenascina-R inibisce la ricrescita degli assoni delle cellule del ganglio retinico di questo urodelo. Dopo schiacciamennto del nervo ottico, l'immunoreattività per la tenascina-R si riduce a livelli non rilevabili nel giro di 8 giorni. Entro questo tempo, diminuisce anche l'immunoreattività per la glicoproteina associata alla mielina (MAG), come evidenziato dalla microscopia elettronica. L'immunoreattività per la tenacina-R torna a essere rilevabile 6 mesi dopo la lesione, in correlazione con la ri-mielinizzazione, come indicato dall'immunoistochimica per MAG. Gli assoni rigeneranti incominciano a ripopolare il nervo lesionato distale 9 giorni dopo lo schiacciamento e crescono, in stretto contatto con presunti processi astrocitari nella periferia del nervo, vicino alla pia, come dimostrato dal loro tracciamento anterògrado[7]. Così, l'inizio della ricrescita assonale oltre il sito della lesione è stato correlato con la rimozione di molecole inibitorie nel nervo ottico, condizione che può essere necessaria per una rigenerazione assonale ben riuscita nel SNC di *Pleurodeled waltl* e degli anfibi in generale (Becker, 1999).

Pleurodeles waltl modello in ricerche sulla rigenerazione della coda dopo amputazione

Il *fibroblast growth factor-1* (FGF-1) e i nervi giocano un ruolo importante durante la rigenerazione degli arti, ma fino a poco tempo fa non era stata dimostrata alcuna correlazione tra questi due fattori di rigenerazione. FGF-2 esogeno, membro della famiglia FGF, che si lega agli stessi recettori ad alta affinità di FGF-1, stimola sia l'incorporazione di ^{3}H-timidina, che l'indice mitotico nel mesenchima e nelle cellule epidermiche di blastemi[8] denervati.

Per verificare se interazioni tra fibre nervose ottenute dal midollo spinale e blastema aumentano il rilascio di FGF-1 bioattivo, è stato usato un modello *in vitro* che mima le interazioni che avvengono *in vivo* durante la rigenerazione dell'arto: il test si basa su co-colture di midollo spinale e di blastema di *Pleurodeles waltl*, su capsule di Petri ricoperte di eparina. Il rilascio di questo fattore di crescita è parso correlare bene con la rigenerazione delle fibre nervose, perché è diminuito in presenza del dipeptide Leu-Ala, noto inibitore della crescita neuronale, mentre in presenza del dipeptide inverso, Ala-Leu, è rimasto invariato. Questi ri-

sultati supportano l'ipotesi che l'interazione tra tessuto nervoso e blatstema sia permissiva del rilascio di FGF-1 che, a sua volta, stimola la proliferazione cellulare delle cellule del blastema (Zenjari, 1997).

Mediante immunofluorescenza e *immunoblot*, durante la rigenerazione post-traumatica della parte distale della coda di *Pleurodeles waltl*, sono stati determinati i *pattern* di espressione di tenascina, glicoproteina della matrice extracellulare. Nelle code normali di questo urodelo adulto, l'espressione di tenascina è per lo più ristretta ad alcuni tessuti connettivi, inclusi il periostio, i legamenti delle articolazioni vertebrali, le strutture miotendinee, il perimisio[9] e la pia madre, mentre la matrice extracellulare è virtualmente negativa. Nei primi 4-6 giorni successivi all'amputazione della coda, l'espressione della tenascina aumenta nella regione del moncone, in aree che circondano i tendini in via di differenziamento, mentre l'epitelio blastemico inziale non la esprime. L'aumento locale di tenascina in aree dove le cellule si differenziano e iniziano a migrare, precede l'aumento di fibronectina che si verifica dopo, nel mesenchima del blastema. A partire dall'8° giorno di rigenerazione, c'è stato un netto aumento del livello dell'espressione di tenascina nella matrice extracellulare del mesenchima sottostante l'epitelio del blastema, che è rimasto negativo. La massima espressione di tenascina nella matrice, raggiunta in rigenerati di 4-6 settimane, è poi scesa gradualmente. Concentrazioni elevate di tenascina sono presenti in siti di condensazione muscolare sotto forma di fibrille orientate parallelamente alla direzione di allineamento delle cellule miogeniche e in siti di condrogenesi, particolarmente in regioni di formazione della pre-cartilagine. Dopo la seconda settimana di rigenerazione, la tenascina è fortemente espressa nella lamina basale della pelle rigenerata e, dopo la quarta settimana, anche a livello delle aree della giunzione dermo-epidermica. Come nella parte terminale delle code normali, in code rigenerate da più di 8-9 settimane, l'espressione della tenascina è confinata quasi solo nel tessuto connettivo muscolare e nelle strutture mielo-tendinee. La possibilità che la tenascina svolga più ruoli morfogenetici in tessuti rigeneranti e in riparazione è stata oggetto di ulteriori ricerche (Arsanto, 1997).

Note

Nota 1. Il corda-mesoderma è la parte del mesoderma, negli embrioni dei cordati, dalla quale derivano la notocorda e le strutture connesse e che induce la formazione delle strutture dell'ectoderma neurale.

Nota 2. Lo *Spemann-Mangold organizer*, noto anche come *Spemann organizer*, è un cluster di cellule nell'embrione in sviluppo degli anfibi che induce lo sviluppo del sistema nervoso centrale. La scoperta dello *Spemann-Mangold organizer* ha introdotto il concetto di induzione nello sviluppo embrionale. Attualmente, il concetto di induzione, integrale al campo dello sviluppo in biologia, si applica al processo per mezzo del quale l'identità di certe cellule influenza il destino dello sviluppo delle cellule circostanti. Hans Spemann (1869-1941) ricevette il premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina nel 1935, per il suo lavoro di descrizione del processo di induzione negli amfibi.

Nota 3. I canali del calcio di tipo "L" fanno parte della famiglia attivata dall'alto voltaggio dei canali del calcio voltaggio-dipendenti. "L" sta per "*long lasting*" e indica la lunga durata della loro attivazione.

Nota 4. Gli "*immediate early genes*" sono geni che attivati transientemente e rapidamente in risposta ad un'ampia varietà di stimoli cellulari e svolgono ruoli importanti in processi come lo sviluppo cerebrale, l'apprendimento e le risposte all'abuso di droghe.

Nota 5. I neuroni propriospinali sono cellule che non proiettano gli assoni fuori dal midollo spinale, ma stabiliscono collegamenti sinaptici inter-segmentali. Il loro ruolo è stato a lungo sottovalutato, ma la loro importanza cruciale nell'adattamento riparativo è stata confermata dalla scomparsa del recupero a seguito della loro distruzione. I neuroni propriospinali connettono pool motoneuronali e reti di interneuroni situati a differenti livelli spinali.

Nota 6. La formazione reticolare è una rete di fibre e centri nervosi che ha inizio dal bulbo, attraversa le strutture del tronco dell'encefalo e raggiunge il talamo ove si fonde con i nuclei della linea mediana; è un importante centro di integrazione sensitivo-motoria. Caratteristici della formazione reticolare sono il polimorfismo e la disseminazione delle sue cellule, con l'intricata disposizione delle fibre orientate in tutte le direzioni, e le vie che, con decorso afferente o efferente, la collegano ai vari livelli del sistema nervoso. La formazione reticolare si può suddividere in tre zone funzionali: centrale, mediana e laterale. I nuclei centrali sono collegati al midollo spinale (via reticolospinale) e hanno azione inibente sul tono posturale e sulle attività riflesse.

Nota 7. Nelle neuroscienze, tracciamento anterògrado (*anterograde tracing*) è un metodo di ricerca usato per tracciare le proiezioni assonali dal loro punto di partenza (corpo cellulare o soma) al loro punto di arrivo terminale.

Nota 8. Blastema è un gruppo di cellule che rimangono a lungo indifferenziate e, proliferando, danno origine ad abbozzi di organi. Nella parte caudale dei vertebrati, un particolare blastema, il teloblastema, dà origine a nuovi metameri, provocando l'accrescimento in lunghezza dell'embrione.

Nota 9. Perimisio è il rivestimento di tessuto connettivo fibrillare che avvolge ogni muscolo; comprende il perimisio esterno o epimisio, e il perimisio interno o endomisio.

Bibliografia

- Arsanto, J. P., Olano, M., Thouveny, Y., Thiery, J. P., and LEVI. G., 1990; Patterns of tenascine expression during tail regeneration in the amphibian urodele Pleurodeles waltl. Development, vol. 109: pp. 177-188
- Becker, C. G., Becker, T., Meyer, L. M., and Schachner, M., 1999; Tenascin-R Inhibits the Growth of Optic Fibers In Vitro But is Rapidly Eliminated during Nerve Regeneration in the Salamander Pleurodeles waltl. The J. Neurosci., vol. 19: 813-817
- Chevallier, S., Landry, M., Nagy, F., Cabelguen, J. M., 2004; Recovery of bimodal locomotion in the spinal-transected salamander, Pleurodeles waltl. Eur. J. Neurosci., vol. 8: pp. 1995-2007
- Duprat, A. M., 1996; What mechanisms drive neural induction and neural determination in urodeles? Int. J. Dev. Biol., vol. 40: pp. 745-754
- Zenjari, C., Boilly, B., Handermarck, H., and Boilly-Marer, Y., 1997; Nerve blastema interactions induce fibroblast growth factor-1 release during limb regeneration in Pleurodeles waltl. Development, Growth & Differentiation, vol. 39: pp. 15-22

PLEURODELES WALTL, ANFIBIO URODELO, MODELLO ANIMALE PER RICERCHE SULLA RIGENERAZIONE RETINICA E SUI RELATIVI MECCANISMI DI ATTIVAZIONE (1ª PARTE)

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Tassonomia, areale geografico e biologia di *Pleurodeles waltl*

La Zoologia Sistematica classifica gli anfibi in urodeli, forniti di coda (tritoni e salamandre) e anuri, senza coda (rane, rospi, raganelle): i primi sono più legati dei secondi all'*habitat* acquatico. Il tritone *Pleurodeles waltl* (Classe: *Amphibia*, Ordine: *Urodela*, Famiglia: *Salamandridae*, Genere: *Pleurodeles*) (fig. 1) descritto, nel 1830, da Georg Michaelles (1807-1834), è un urodelo endemico della penisola iberica centro-meridionale e del nord del Marocco, dalle coste atlantiche a quelle mediterranee. E' comunemente chiamato *Iberian sharp-ribbed newt* per le costole puntute e taglienti con le quali, quando si sente minacciato o è morsicato da un predatore, mette in atto un originale comportamento difensivo, basato su un primitivo e rudimentale sistema di inoculo di sostanze tossiche e irritanti: sporge le costole verso l'esterno, fino a formare un angolo di ~50° con la spina dorsale; le costole, appuntite, forano la parete corporea (fig. 2), mentre ghiandole cutanee secernono un veleno lattiginoso e irritante che va a ricoprire le punte delle costole stesse. Innocuo per l'uomo, è un meccanismo molto efficace, pungente e doloroso, che inietta tossine attraverso la sottile mucosa orale del predatore di turno, provocandogli un forte dolore e, talora, causandone la morte. L'efficiente sistema immunitario del tritone, e il collagene che ricopre le costole, facilitano la rapida cicatrizzazione della cute, senza che insorgano infezioni (Spanish ribbed newt, 2010; Rosania, 2014).

In natura, *Pleurodeles waltl* misura ~28 (♀) ÷ 31 (♂) cm, ma in cattività raramente supera i 20 cm; la cute dorsale è grigio-marrone, talvolta chiazzata da spot scuri irregolari, mentre

Fig. 1. *Pleurodeles waltl* (da: ittiofauna.org)

Fig. 2. *Pleurodeles waltl*: sono evidenti le costole appuntite che forano la parete corporea in corrispondenza delle piccole chiazze color giallo-arancione-ruggine, simili a verruche, allineate sui due fianchi della parete corporea (da: calphotos,berkeley.edu)

quella ventrale è più chiara; sui due fianchi presenta una fila di piccole chiazze color giallo-arancione-ruggine, simili a verruche, in corrispondenza dei punti di fuoruscita delle costole accuminate. La testa è piatta e larga, a forma di vanga, gli occhi sono piccoli con palpebre mobili; la coda, più lunga nei maschi, rappresenta circa il 50% della lunghezza corporea, è assottigliata verso la punta ed è particolarmente adatta al nuoto; generalmente i maschi sono più sottili e leggeri delle femmine (Rosania, 2014).

Pleurodeles waltl è più legato all'*habitat* acquatico di altri urodeli europei: sebbene si muova facilmente sul terreno, molto raramente lascia l'acqua e vive in stagni, cisterne e pozzi di antichi villaggi, frequenti in Portogallo e Spagna. Predilige acque fresche, ossigenate e tranquille, in lento movimento, ricche di vegetazione e poco profonde, dove si nutre di insetti, vermi e girini. Il sesso è determinato dai cromosomi sessuali, ma la temperatura può prevalere sul genotipo nella determinazione sessuale. Nella femmina, i cromosomi sessuali sono Z e W, mentre il maschio ha 2 cromosomi Z (ZZ). Nelle larve allevate a 32°C, nello stadio di gonadogenesi iniziale, il fenotipo dei testicoli si differenzia in modo non conforme al genotipo: si verifica un'inversione sessuale che dà luogo a *neomales* funzionali (*sex-reversed females*).

Nel 2004, *Pleurodeles waltl* è stato classificato come *Least Concern Species* e, nel 2006, l'Unione Mondiale per la Conservazione della Natura (IUCN) l'ha inserito nella *Red List* delle specie quasi a rischio (*Near Threatened*), perchè è in significativo declino, a causa della diffusa erosione dell'*habitat* acquatico naturale in cui vive, causata dal drenaggio delle acque e all'introduzione e diffusione di specie invasive, come la trota persico (*Micropterus salmoides*) e il gambero *Procambarus clarkii*, voraci predatori di uova e girini di questo tritone. Altri fattori di minaccia sono l'inquinamento agrochimico, l'impatto degli allevamenti di bestiame sull'ambiente, la contaminazione domestica e industriale, il proliferare dei campi da golf e lo sviluppo delle infrastrutture. A ciò si deve aggiungere la mortalità dovuta… al traffico stradale, seria minaccia per gli investiti (i tritoni), ma anche per gli investitori (gli automobilisti).

Pleurodeles waltl è ormai quasi scomparso dalle aree costiere della penisola iberica e del Marocco, dai pressi delle zone a intensa attività turistica e delle aree a elevata antropizzazione; nella zona di Madrid non c'è più traccia della sua presenza.

Pleurodeles waltl modello animale nelle ricerche sulla rigenerazione della retina neurale

Vari modelli animali di distacco della retina neurale (RN) sono stati messi a punto e usati per studiare le potenzialità rigenerative della RN e la fisiologia della rigenerazione nei vertebrati inferiori. Gli anfibi urodeli e, tra questi, i tritoni e le salamandre, hanno un notevole potenziale di rigenerazione dei tessuti dell'occhio. Tra questi, *Pleurodeles waltl* adulto è il classico *test system* per ricerche sulla fisiologia della rigenerazione della RN, sui segnali molecolari, sull'espressione genica, sulle risorse interne e sulle componenti cellulari che partecipano al processo rigenerativo: a differenza di altri vertebrati, questo tritone, infatti, mantiene il potenziale rigenerativo delle strutture oculari durante tutto il ciclo vitale, rappresentando il modello animale di elezione per lo studio dei fenomeni rigenerativi dell'occhio dei vertebrati.

In questa prima parte dell'articolo ci occuperemo della struttura della retina di *Pleurodeles waltl*, delle ricerche sulla rigenerazione retinica e dei segnali molecolari che l'accompagnano.

Il primo ricercatore a studiare, a livello macroscopico, la rigenerazione di tessuti dell'occhio del tritone, fu lo svizzero C. Bonnet (1781), con risultati confermati a livello morfologico da J.M. Philippeaux (1880), C. Griffin (1889), V.L. Colucci (1891) e G. Wolff (1895) che dimostrarono, in questa specie, la completa rigenerazione di cristallino e retina.

Gli occhi di tutti i vertebrati sono "costruiti" secondo un piano comune (fig. 3); in particolare, la retina dei tritoni adulti consta di vari strati, dalla superficie basale, delimitata dalla

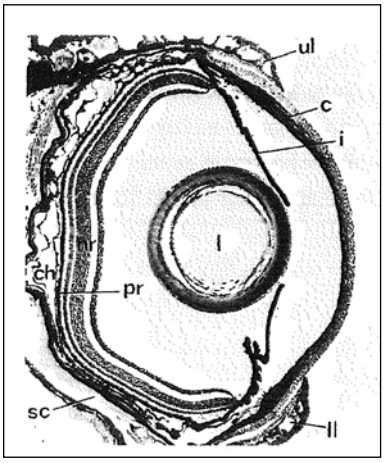


Fig. 3. Preparazione istologica dell'occhio di un tritone adulto; sezione verticale meridionale dell'occhio: cornea (c), cristallino (l), iride (i), RN neurale (nr), epitelio retinico pigmentato (pr), coroide (ch), palpebra inferiore (ll), sclera (sc), palpebra superiore (ul) (da: Reyer, R.W., The amphibian eye: development and regeneration, in: Handbook of Sensory Physiology, Vol. YII/5, part A (Ed. F. Crescitelli), Springer-Verlag, Berlin, pp. 309-390, 1977).

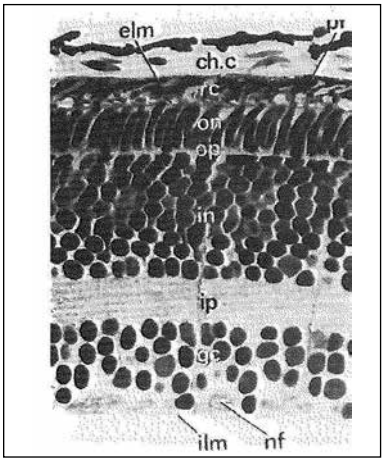


Fig. 4. Preparazione istologica della RN neurale e pigmentata di *Pleurodeles waltl*: membrana limitante interna (ilm), strato delle fibre nervose (nf), strato delle cellule gangliari (gc), strato plessiforme interno (ip), strato nucleare interno (in), strato plessiforme esterno (op), strato nucleare esterno (on), membrana limitante esterna (elm), strato dei coni e bastoncelli (rc), epitelio retinico pigmentato (pr; nel testo: ERP), strato coriocapillare (ch.c) (da: Reyer, R.W., The amphibian eye: development and regeneration, in: Handbook of Sensory Physiology, Vol. YII/5, part A (Ed. F. Crescitelli), Springer-Verlag, Berlin, pp. 309-390, 1977).

membrana limitante interna, alla superficie apicale, delimitata dalla membrana limitante esterna: strato delle fibre nervose, strato delle cellule gangliari, strato plessiforme interno, strato nucleare interno, strato plessiforme esterno, strato nucleare esterno e strato dei coni e bastoncelli, epitelio retinico pigmentato (ERP), strato coriocapillare (fig. 4). I segmenti esterni dei coni e bastoncelli sono a diretto contatto con l'ERP, monostrato di cellule epiteliali cuboidali densamente pigmentate che presiedono a varie funzioni fisiologiche: coinvolte nel processo della visione, forniscono nutrienti alla RN e fagòcitano gli *shed disks* (dischi di copertura dei segmenti esterni di bastoncelli e coni, formati da successive ripiegature della membrana esterna), nel processo di rinnovamento dei fotorecettori dell'occhio. RN e ERP derivano da uno stesso abbozzo embrionale. Poiché la RN ha una polarità invertita, la sua superficie apicale è rappresentata dalla membrana limitante esterna, mentre la membrana limitante interna corrisponde alla sua superficie basale. L'ERP possiede una notevole plasticità negli stadi precoci dello sviluppo embrionale: le sue cellule rispondono a stimoli inducenti, trans-differenziandosi in cellule retiniche. A differenza di altri vertebrati, in certi urodeli adulti, tra i quali *Pleurodeles waltl*, l'ERP è la fonte principale di cellule per la rigenerazione di una re-

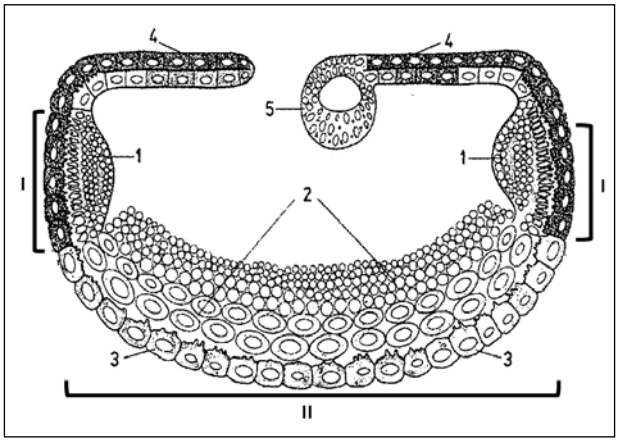


Fig. 5. Disegno schematico della rigenerazione dell'occhio in un tritone adulto: zona priferica (I), parte centrale del fondo dell'occhio (II), abbozzo neuroepiteliale formato dall'ora serrata (1), abbozzo neuroepiteliale (2) formato dalle cellule dell'epitelio retinico pigmentato (ERP), cellule dell'ERP (3), iride (4), cristallino rigenerante (5). In stadi precoci della rigenerazione della RN, tutte le cellule dell'ERP alla periferia dell'occhio incorporano ^{3}H-DOPA (l'indice di marcatura con ^{3}H-timidina è del 4-6%). Durante la formazione dell'abbozzo neuroepiteliale, ^{3}H-DOPA non è incorporata nelle cellule della parte centrale del fondo dell'occhio; la marcatura con ^{3}H-timidina nell'ERP è pari al 40-50%, mentre nell'abbozzo neuroepiteliale è del 70-80%. Le cellule dell'abbozzo neuroepiteliale bistratificato contengono granuli di melanina, perché l'abbozzo si è formato dall'ERP, granuli assenti nell'abbozzo multistratificato (da: Stroeva e Mitashov, 1983)

tina danneggiata o rimossa: durante la rigenerazione, le sue cellule si differenziano in cellule dell'abbozzo retinico neuroepiteliale. In mancanza di marcatori cellulari affidabili, la fonte di cellule per la ricostruzione della RN è stata individuata, in modo più o meno convincente, in precursori cellulari debolmente differenziati, situati nella zona periferica di crescita della RN o solo nelle cellule differenziate dell'ERP (fig. 5). Tuttavia, a metà degli anni '70 del secolo scorso, si comprese che ambedue le ipotesi hanno una base scientifica: la RN dei tritoni adulti si rigenera grazie alla proliferazione cellulare sia nella zona di crescita della RN che nell'ERP. Successivamente si dimostrò in anfibi, pesci, uccelli e mammiferi, che crescita dell'occhio e rigenerazione della RN dipendono da più fonti cellulari. Esperimenti con ^{3}H-timidina, retrovirus e coloranti fluorescenti usati come *marker* nucleari e citoplasmatici, hanno mostrato, nei tritoni e in altri vertebrati, che nella zona periferica della RN sono presenti precursori cellulari scarsamente sviluppati, cioè neuroblasti indifferenziati o cellule germinali neuroepiteliali (Wetts, 1991).

In *Pleurodeles waltl* adulti, precursori cellulari localizzati nella periferia della RN, sono implicati nella crescita normale dell'occhio. Rimossa o danneggiata la RN in condizioni ischemiche, questi precursori cellulari forniscono cellule per la rigenerazione della sola parte periferica della RN. Questo risultato rispecchia il limite del potenziale di crescita della zona periferica: la completa rigenerazione della RN non si realizza a esclusivo carico dei precursori cellulari della zona di crescita. Anche se le cellule della zona di crescita sono rimosse, la completa rigenerazione della RN è possibile solo grazie alle cellule dell'ERP, il cui ruolo di fonte principale di cellule per la rigenerazione della RN è stato dimostrato con vari modelli sperimentali, inclusa la rimozione parziale/completa della RN, la resezione del nervo ottico e dell'arteria oftalmica, il trapianto delle cellule dell'ERP nella cavità oculare del tritone e il trapianto dell'occhio intero. In studi morfologici sperimentali sulla rigenerazione retini-

Fig. 6. Crescita di una retina neurale addizionale (2) derivante dall'epitelio retinico pigmentato, dopo il distacco della retina originale (1) in un tritone adulto (da: Grygorian E.R. (2012) Shared Triggering Mechanisms of Retinal Regeneration in Lower Vertebrates and Retinal Rescue in Higher Ones. In: Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application. DOI: 10.5772/25883 · Source: InTech)

ca, sono stati usati granuli di melanina, come *marker* citoplasmatico naturale, per tracciare la trasformazione graduale dell'ERP in cellule neuroepiteliali: durante il processo, le cellule dell'ERP perdono gradualmente il pigmento e incominciano a proliferare. Il contenuto iniziale di melanina in queste cellule è talmente elevato che la depigmentazione richiede molto tempo. Quando l'abbozzo neuroepiteliale in sviluppo raggiunge lo stadio di 2-3 strati cellulari, le sue cellule contengono ancora sufficiente pigmento da permettere di tracciarne lo spiazzamento graduale dallo strato dell'ERP alla cavità oculare. Preparazioni istologiche, fatte in questo stadio, mostrano chiaramente il confine tra il neuroepitelio pigmentato derivante dall'ERP (nella parte centrale del fondo dell'occhio) e il neuroepitelio formato dalla zona di crescita, le cui cellule sono apigmentate (Mitashov, 1996). Studi successivi, fatti impiegando metodi di marcatura dei nuclei delle cellule dell'ERP con ^{3}H-timidina (Stroeva, 1983) o marcando i loro citoplasmi con anticorpi monoclonali specifici (Klein, 1990), hanno fornito evidenze conclusive sul ruolo dell'ERP nella rigenerazione della RN. Rimossa la RN di *Pleurodeles waltl* adulti, le cellule proliferanti dell'ERP sono state marcate con ^{3}H-timidina; gli animali sono stati fissati vari giorni dopo l'intervento chirurgico, durante la formazione dell'abbozzo retinico neuroepiteliale contenente cellule marcate, la cui marcatura era diluita a causa delle precedenti divisioni cellulari. Dal confronto dell'intensità della marcatura nelle cellule iniziali dell'ERP, con quella delle cellule neuroepiteliali neoformate, è emerso chiaramente che il neuroepitelio originava dalle cellule dell'ERP (Klein, 1990).

Questi dati sono stati confermati da esperimenti fatti con anticorpi monoclonali ERP-1 contro specifici antigeni citoplasmatici delle cellule dell'ERP. La melanina è un prodotto specifico delle cellule dell'ERP e la ^{3}H-diidrofenilalanina (^{3}H-DOPA), precursore specifico della melanina, ha funzionato da marcatore citoplasmatico adatto per stimare il numero delle cellule dell'ERP che vanno a formare l'abbozzo retinico neuroepiteliale (Mitashov, 1980). L'analisi delle variazioni del ritmo di sintesi della melanina durante la rigenerazione della RN (fig. 5) ha evidenziato una peculiarità interessante: le cellule dell'ERP, coinvolte nella formazione dell'abbozzo neuroepiteliale, situate nella zona centrale del fondo dell'occhio, non incorporano ^{3}H-DOPA: la sintesi del componente specifico per l'ERP in questa sub-popolazione cellulare è inibita. Al tempo stesso, le cellule dell'ERP, localizzate alla periferia dell'occhio, non partecipano alla rigenerazione della RN: la piccola parte periferica dell'abbozzo neuroepiteliale si sviluppa grazie alla proliferazione di cellule debolmente differenziate della zona

di crescita (fig. 5). Al contrario, cellule della zona periferica dell'ERP vanno incontro a parziale depigmentazione e rispondono immediatamente, riprendendo la sintesi della melanina, come dimostrato da autoradiografie che indicano l'incorporazione di ^{3}H-DOPA nel loro citoplasma. I dati relativi all'incorporazione di ^{3}H-DOPA mostrano che il 60-70% delle cellule dell'ERP non incorpora il radioligando. Queste cellule, quindi, sono coinvolte nella formazione dell'abbozzo neuroepiteliale (Mitashov, 1980). Due sono i principali meccanismi alla base della formazione dell'abbozzo neuroepiteliale dalle cellule dell'ERP. Il primo diventa operativo dopo la rimozione chirurgica della RN: le cellule dell'ERP iniziano a perdere pigmento e proliferano; i fusi mitotici di certe cellule proliferanti dell'ERP sono perpendicolari alla coroide, così una delle due cellule figlie è smistata nella cavità oculare, mentre l'altra perde parte del pigmento e rimane nello strato dell'ERP, dimostrando che l'abbozzo neuroepiteliale ha uno sviluppo asincrono. In un›altra specie di urodelo, il *Triturus cristatus*, le cellule dell'ERP proliferano soprattutto in due zone: attorno al nervo ottico e al vaso anulare. Al contrario, bloccando il supporto sanguigno all'occhio, il primo *step* è la degenerazione della RN, seguita da un'intensa e remota migrazione di cellule pigmentate dallo strato dell'ERP nella cavità oculare. Queste cellule perdono il pigmento, proliferano e formano un neuroepitelio che origina una nuova RN. Le cellule che rimangono nello strato dell'ERP fagòcitano i componenti della RN in degenerazione, funzionando come macrofagi che entrano nella cavità oculare. In un primo tempo, queste cellule perdono parzialmente i granuli di pigmento, poi diventano nuovamente pigmentate, ricostituendo l'iniziale strato dell'ERP. La popolazione cellulare dell'ERP non comprende particolari sotto-popolazioni di cellule poco differenziate che potrebbero servire come fonte ipotetica di cellule specifiche per la rigenerazione retinica. Un'importante caratteristica dell'ERP è il funzionamento simil-macrofagico delle sue cellule, che diventa particolarmente evidente in esperimenti che recidono/occludono l'arteria oftalmica. Le percentuali di cellule dell'ERP coinvolte nella fagocitosi dei frammenti della RN distrutta, e nella formazione dell'abbozzo retinico neuroepiteliale sono, probabilmente, determinate a caso (Mitashov, 1996).

Meccanismi di attivazione della rigenerazione retinica condivisi da vertebrati inferiori e superiori

Sotto la RN dell'occhio dei vertebrati si stende l'ERP: l'interconnessione RN↔ERP è critica per lo sviluppo, la rigenerazione e le funzioni di ambedue i compartimenti della RN. Un'alterazione della normale correlazione quantitativa delle cellula dell'ERP e i fotorecettori, della loro integrità strutturale e funzionale, inevitabilmente porta a un'interruzione del ciclo visivo e induce la patologia retinica. La maggioranza delle malattie retiniche - innate, legate all'invecchiamento o sistemiche - può esser messa in relazione ad uno sbilanciamento del rapporto RN↔ERP.

In laboratorio, si può ottenere la disgregazione di NR↔RPE in certe condizioni, quali la separazione e l'espianto della RN, l'eliminazione dei fotorecettori tramite luce accecante, danno chimico o meccanico dell'ERP e dei fotorecettori. Il ricorso a modelli sperimentali in studi sulla RN di vertebrati inferiori e superiori può fornire, da una parte, una vasta e approfondita comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari delle patologie retiniche e, dall'altra, dei meccanismi naturali del suo ricupero.

Negli anfibi urodeli la rimozione totale della RN o il distacco della RN artificiale porta al trans-differenziamento delle cellule dell'ERP che, dopo 2 mesi, origina la rigenerazione di una RN funzionante (Chiba, 2007). Nei mammiferi, non è stata riportata la rigenerazione della RN a partire dall'ERP. Il distacco della RN causa serie complicazioni e patologie da abba-

gliamento, nonostante l'accensione di alcuni meccanismi protettivi per il recupero della RN.

L'inizio della rigenerazione retinica negli urodeli e il suo salvataggio nei mammiferi, come pure il procedere degli eventi successivi, sono rappresentati da processi comprensivi, nei quali prendono parte varie famiglie molecolari e *pathway* di segnalazione. Queste molecole, introdotte dalla RN e da tessuti adiacenti e, in particolare dall'ERP, giocano importanti ruoli di controllo e di regolazione.

a) Alterazioni dei contatti e del comportamento delle cellule retiniche

La matrice inter-fotorecettori (IPM), interfaccia tra RN ed ERP, svolge il ruolo di dialogo chimico incrociato tra i due tessuti per una loro funzione coordinata. L'IPM è formata dai componenti della matrice extracellulare, la cui alterazione causa spesso il distacco della RN. Per esempio, quando il condroitin 6-solfato della IPM è danneggiato da iniezioni intravitreali *in vivo* di xiloside (glicoside, il cui zucchero è lo xilosio, inibitore della sintesi di condroitin-solfato proteoglicano), si può osservare un distacco poco profondo della RN. Ciò suggerisce che l'adesione tra RN e ERP dipenda dalla sintesi ininterrotta dei proteoglicani della IPM. Ci sono, inoltre, evidenze che le molecole della IPM responsabili dell'adesione abbiano anche un effetto neuroprotettivo. Per esempio, la galectina-3[1] di ratto, che partecipa all'adesione NR↔ERP, inibisce l'apoptosi attraverso le *pathway* della bcl-2 (proteina reagolatoria dell'apoptosi) o delle cisteina proteasi e, al contrario, l'iniezione intravitreale di un anticorpo anti-galectina-3 accelera la degenerazione dei fotorecettori causata dalla luce costante (Uehara, 2001).

L'IPM è una struttura molto differenziata, situata tra i fotorecettori e l'ERP e i suoi componenti sono molto differenti da quelli di una tipica matrice extracellulare. La IPM, importante nel mantenimento dei fotorecettori e dell'ERP, va incontro ad alterazioni caratteristiche nelle degenerazioni della RN; la comprensione della patologia mediata dalla IPM potrebbe sfociare nello sviluppo di nuovi target terapeutici.

La disgregazione della IPM, il/la successivo/a indebolimento/perdita dei contatti laterali dell'ERP e l'attacco alla RN neurale e alla membrana di Bruch (membrana al di sotto dell'ERP, è lo strato più interno della coroide, punto di unione fra la coriocapillare e l'epitelio pigmentato della RN) inducono un cambiamento del comportamento delle cellule dell'ERP. Parallelamente, dopo il distacco della RN neurale, quando parte dei fotorecettori degenera, una quantità di loro frammenti cellulari supera la capacità di fagocitarli delle cellule dell'ERP. In risposta alle alterate condizioni, l'ERP manifesta le capacità multipotenziali delle sue cellule. Dopo la rimozione della RN dei tritoni, ERP smette di sintetizzare melanina e aumenta l'attività proliferativa delle sue cellule (Grigoryan, 1979). Negli stessi animali, dopo il distacco della RN, anche l'ERP può mostrare l'esclusiva capacità di trans-differenziarsi in cellule retiniche, fino a formare una nuova RN neurale addizionale (fig. 6) (Grigoryan, 1985).

Altra potenzialità di differenziamento nota dell'ERP degli urodeli è la loro trasformazione in cellule mobili dotate di molte delle caratteristiche tipiche dei macrofagi. Usando colture organotipiche in 3D del settore posteriore dell'occhio di ratto (ERP + coroide + sclera), si è trovato che anche ERP origina macrofagi, cellule con 2 nuclei, morfologicamente differenti dai tipici monociti ed esprimenti antigeni specifici dei macrofagi (Grigoryan, 2007; Novikova, 2010). In alternativa, o in aggiunta, l'ERP dei mammiferi può proliferare e partecipare alla formazione di uno strato multilaminare di cellule con caratteristiche mesenchimali in tessuto connettivo. Il processo della transizione dell'ERP a miofibroblasti è un attributo della ben nota patologia fibrotica, vitreoretinopatia proliferativa (Saika, 2008).

Si pensa che varie molecole abbiano un ruolo nel preservare intatto il complesso fotorecettori-ERP: tra queste sono la Na-K-ATPasi, la componente solubile della *interphotoreceptor retinoid-binding protein* (IRBP, che funziona come *carrier* a due vie del retinoide, attraverso il comparti-

mento acqueo (IPM) che separa l'ERP e i fotorecettori) (Gonzales-Fernandez, 2003), i *mucin-type components* dell'IPM, per l'adesione della RN, e i *serum-type components* per il trasporto dei metaboliti. Nella RN esterna, i contatti cellula-cellula e tessuto-tessuto partecipano al mantenimento dell'integrità della RN e il/la loro danneggiamento/distruzione porta alla morte delle cellule della RN e alla trasformazione del tipo cellulare dell'ERP, sia nei vertebrati inferiori sia in quelli superiori.

b) Alterazioni del ciclo visivo e apoptosi

Un altro evento che si verifica subito dopo la separazione della RN dall'ERP sono i disturbi del ciclo visivo: quest'ultimo rappresenta un complesso di reazioni biochimiche per la rigenerazione del cromoforo visivo 11-cis-retinale[2] dall'all-trans retinolo. Dopo danneggiamento della interconnessione RN↔ERP causato da patologie innate o acquisite, il ciclo visivo va inevitabilmente incontro a disturbi e svolge un ruolo nell'iniziazione e nell'evoluzione delle patologie oculari. Studi di biologia molecolare sul distacco della RN indicano una sostanziale inibizione dei geni codificanti per le proteine coinvolte nel ciclo visivo.

Negli urodeli, la PCR dell'ERP di un occhio intatto, confrontata con quella dell'ERP di un occhio nel quale la RN era stata appena staccata, ha indicato una considerevole diminuzione del trascritto di RPE65[3] (Avdonin, 2008). Altri risultati indicano che RPE65, nelle cellule derivate dall'ERP di un rigenerato precoce di RN, è l'unica vestigia residua dopo la degradazione o rimozione delle proteine. Quando NR e ERP sono disintegrati, si registra non solo una riduzione della sintesi delle proteine del ciclo visivo, ma anche una traslocazione delle proteine nei compartimenti interni dei fotorecettori, fenomeno osservato, non immediatamente, in esperimenti sul modello del distacco della RN nel tritone *in vivo* o in RN isolate e coltivate *in vitro*. In questi esperimenti, è stata usata recoverina (proteina coinvolta nella regolazione Ca-dipendente della fosforilazione della rodopsina) come proteina marker dei fotorecettori (Grigoryan, 2007; Grigoryan 2009; Novikova, 2010). In ambedue i casi, la RN dei tritoni ha mantenuto la capacità di esprimere recoverina, ma la sua immunoreattività è stata spiazzata dai segmenti dei pericari e dagli assoni dei fotorecettori. Lo stesso fenomeno è stato osservato *in vitro*, in colture di retine (Grigoryan, 2012).

Un altro fenomeno, indotto dalla separazione sperimentale della RN, è l'attivazione della sintesi del DNA mitocondriale nei fotorecettori retinici (incorporazione di BrDU), localizzata nei segmenti interni dei fotorecettori e interpretata come tentativo delle cellule dei fotorecettori di salvarsi ed evitare l'apoptosi.

Disturbi del ciclo visivo e/o altre co-reazioni NR↔ERP portano le cellule dei fotorecettori all'apoptosi: questo può essere il risultato dell'accumulo di molecole attive fotochimicamente e di *reactive oxygen species* (ROS) che, in assenza di un ciclo visivo regolare, innescano la cascata apoptotica.

L'apoptosi che si verifica negli Urodeli a seguito dell'ablazione della RN è stata studiata mediante una tecnica in situ per il rilevamento della frammentazione del DNA. Si è osservato che l'apoptosi si verifica non solo subito dopo la rimozione della RN, ma anche alla fase iniziale della rigenerazione della RN. Quindi, immediatamente dopo la separazione di RN↔ERP, sia negli urodeli sia nei mammiferi, la morte cellulare programmata è un'ulteriore risposta cellulare alla comunicazione che NR↔ERP è stata distrutta nella RN (Grigoryan, 2012).

c) Cambiamenti nei sistemi vascolare e immunitario

Nell'occhio dei vertebrati, NR e ERP sono un'unità strutturale che funziona solo quando i due tessuti sono interattivi. Altri tessuti dell'occhio, la sua parete posteriore, vale a dire la membrana di Bruch e il rivestimento coroidale sottostante l'ERP, provvedono anche all'inte-

grità e alla funzione retinica. E' noto che occlusioni vascolari, formazione di trombosi, accumulo di fibrinopeptidi e di cellule e proteine infiammatorie, partecipano tutti a molte patologie oculari che accompagnano la separazione RN↔ERP.

Durante interventi di chirurgia oculare per la rimozione della RN negli Urodeli, l'occlusione dei piccoli vasi della coroide, un'infiammazione e una diminuzione della tensione dei tessuti della parete posteriore dell'occhio sono gli eventi precocissimi che portano, in seguito, alla conversione del tipo cellulare dell'ERP, alla proliferazione cellulare e alla ritrazione dallo strato (Grigoryan, 1979). Nei tritoni, la trombina (co-responsabile dell'omeostasi e di altre risposte immediate a qualunque tipo di danno) sembra essere un regolatore del trans-differenziamento dell'iride (Imokawa, 2004). La trombina deriva dalla pro-trombina, attivata da fattori di coagulazione e, in particolare, dalla proteina trans-membrana TF (*tissue factor*). L'espressione di TF correla, topologicamente e nel *time course*, con la rigenerazione della lente. TF, e altre molecole responsabili della formazione dei coaguli, sembrano assumere il ruolo di "iniziatori" della rigenerazione di tessuti nei vertebrati inferiori. Il coinvolgimento del sistema del complemento è stato rivendicato nella rigenerazione della zampa e del cristallino degli anfibi urodeli e, più di recente nella rigenerazione della RN del pulcino. Non si può escludere che analoghi meccanismi diano origine al ricupero della RN nei mammiferi. D'altra parte, leucociti attivati, associati al sistema TF/trombina/fibrina, possono svolgere un ruolo importante nell'iniziazione della rigenerazione epimorfica[4] della RN negli anfibi e del ricupero della RN nei mammiferi. Si ipotizza che, subito dopo il danno inferto al tessuto retinico, i leucociti attivati possano produrre *fibroblast growth factor* (FGF), svolgendo un ruolo chiave nella rigenerazione e nel ricupero della RN (Song, 2010), oggetto della 2ª parte di questo articolo.

La rassegna dei principali aspetti del processo rigenerativo della RN danneggiata o rimossa, che hanno trovato spiegazione grazie ai modelli sperimentali basati su *Pleurodeles waltl*, prosegue nella seconda parte di questo articolo sul ruolo fondamentale di questo modello animale nelle ricerche sull'espressione di fattori di crescita e sulle maggiori *pathways* di segnalazione nel corso della rigenerazione della RN.

Note

Nota 1. Galectin-3 è un membro della famiglia delle lectine. Ha massa molecolare di circa 30 kDa e contiene un dominio *carbohydrate-recognition-binding* di circa 130 aa, che permette il legame specifico dei β-galattosidi. E' anche membro della famiglia di proteine β-*galactoside-binding* e gioca un ruolo importante nell'adesione cellula-cellula, nelle interazioni cellula-matrice, nell'attivazione dei macrofagi, nell'angiogenesi, nella metastatizzazione e nell'apoptosi.

Nota 2. Il retinalele, o aldeide della vitamina A, è una delle molte forme della vitamina A. Il retinale, il cui nome deriva dalla sua presenza nella RN dell'occhio, è un cromoforo polienico che, legato a proteine dette opsine, costituisce la base chimica della vista.

Nota 3. Il trascritto di RPE65 è la RNl pigment epithelium-specific 65 kDa protein (RPE65), nota anche come retinoid isomeroidrolasi, è un enzima del ciclo visivo dei vertebrati. RPE65 si trova nell'ERP ed è responsabile della conversione degli esteri di all-trans-retinyl a 11-cis-retinol durante la fototrasduzione.

Nota 4. In biologia, l'epimorfòsi è un processo rigenerativo in cui la parte rigenerata si costituisce a spese di un tessuto interamente neoformato, senza cioè che intervengano cellule pre-esistenti. Si contrappone a morfallassi.

Bibliografia

- Avdonin, P., Markitantova, Iu., Zinov'eva, R. & Mitashov, V., 2008; Expression of regulatory genes: Pax6, Otx2, Six3, and FGF2 during newt RN regeneration. Biology Bulletin, No.4, pp. 414-421, ISSN 0002-3329
- Chiba C. & Mitashov V., 2007; Cellular and molecular events in the adult newt RNl regeneration. In: Strategies for RNl tissue repair and regeneration in vertebrates: from fish to human, Ch. Chiba, (Ed.), 15-33, Research Singnpost. ISBN 978-81-308-0200-8. Trivandrum. India
- Gonzalez-Fernandez, F., 2003: Interphotoreceptor retinoid-binding protein - an old gene for new eyes, Vision Research, Vol. 43, No. 28, pp. 3021-3036, ISSN 0042-6989
- Grigoryan, E. & Mitashov, V. (1979). Radioautographic investigation of proliferation and melanin synthesis in RNl pigment epithelium cells during eye regeneration in the newt, Ontogenez, vol. 10: pp. 137-144, ISSN 0475-1450
- Grigoryan, E. & Mitashov, V., (1985). Cultivation of RNl pigment epithelium in the cavity of the lensectomized newt eye, vol. 16: No. 1, pp. 34-43, ISSN 0475-1450
- Grigoryan, E., 2007; Alternative intrinsic cell sources for neural RN regeneration in adult urodelean amphibians. In: Strategies for RNl tissue repair and regeneration in vertebrates: from fish to human, Ch. Chiba, (Ed.), 35-62, ISBN 978-81-308-0200-8.Trivandrum. India
- Grigoryan, E., Bazhin, A., Krasnov, M. & Philippov, P., 2009; Expression of Ca-binding protein recoverin in normal, surviving, and regenerating RN of Pleurodeles waltl adult triton, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Vol. 148, No. 1, pp. 155- 162, ISSN 0007-4888
- Grigoryan, E. (2012); Shared Triggering Mechanisms of RNl Regeneration in Lower Vertebrates and RNl Rescue in Higher Ones. In: Medicine Tissue Engineering and Regenerative Medicine. «Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application», Chapter 7 - Book edited by Jamie Davies, ISBN 978-953-51-0387-5, Published: March 30, 2012
- Klein, L. R. et al., 1990; Immunolabeling by a newt RNl pigment epithelium antibody during RNl development and regeneration. J. Comp. Neurol., vol. 293: pp.331-339
- Imokawa, Y., Simon, A. & Brockes, J., 2004; A critical role for thrombin in vertebrate lens regeneration, Philosophical Transactions of the Royal Society (London) Biological Sciences, Vol. 359, pp. 765–776. ISSN 1471-2970

- Mitashov, V. I., 1980; Radiographic examination of melanin synthesis in pigment epithelium cells of the newt RN. Ontogenes, vol. 11: pp.246-250
- Mitashov, V. I., 1996; Mechanisms of neural regeneration in urodeles. Int. J. Dev. Biol., vol 40: pp. 833-844
- Novikova, Yu., Aleinikova, K., Poplinskaya, V. & Grigoryan E., 2010: The RNl pigment epithelial cells of the adult newt and rat under conditions culture, Biology Bulletin, No.3, pp. 221–230, ISSN 0002-3329
- Rosania, K., 2014; Newt with superpowers. Laboratory Animal Europe, vol. 14: p. 34
- Saika, S., Yamanaka, O., Flanders, K., Okada, Y., Miyamoto, T.. Sumioka, T., Shirai, K., Kitano, A., Miyazaki, K., Tanaka, S. & Ikeda, K., 2008: Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis, Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets, Vol. 8, No.1, pp. 69-76 - ISSN 1871-5303
- Song, J-S., Lee, J. & Kay, E., 2010; Induction of FGF-2 synthesis by IL-1β in aqueous humor through P13-Kinase and p38 in rabbit corneal endothelium, Investigative Ophthalmology and Visual Science, Vol. 51, No.2, pp. 822–829, ISSN 1552-5783
- Spanish ribbed newt - *Pleurodeles waltl*, The BioFresh Cabinet of Freshwater Curiosities.
- http://cabinetoffreshwatercuriosities.com/2010/11/11/spanish-ribbed-newt/
- Stroeva, O. G., and Mitashov, V. I., 1983; RNl pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration. Int. Rev. Cytol, vol. 83: pp. 221-293
- Uehara, F.; Ohba, N. & Ozawa, M., 2001; Isolation and characterization of galectins in the mammalian RN, Investigative Ophthalmology and Visual Science, Vol. 42, pp. 2164-2172, ISSN 0146-0404
- Wetts, R., and Fraser, S. E., 1991; Microinjection of fluorescent tracers to study neuronal cell lineage. Development 2 (Suppl): pp. 1-8

PLEURODELES WALTL, ANFIBIO URODELO, MODELLO ANIMALE PER RICERCHE SU SEGNALI MOLECOLARI, ESPRESSIONE GENICA, RISORSE INTERNE E TIPI CELLULARI COINVOLTI NELLA RIGENERAZIONE DELLA RETINA (2ª PARTE)

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Nella seconda parte dell'articolo sul modello animale *Pleurodeles waltl* nelle ricerche sulla rigenerazione della retina neurale, danneggiata o distrutta, prosegue la rassegna dei principali aspetti di questo processo rigenerativo che hanno trovato spiegazione grazie ai modelli sperimentali basati su questo anfibio urodelo.

Segnali molecolari di controllo della rigenerazione della RN

Dall'analisi comparata della rigenerazione della retina neurale (RN) nei vertebrati si evince che questo processo può essere portato a termine solo in presenza di cellule che provvedono, esse stesse, alla rigenerazione e alla crescita dell'organo danneggiato o asportato/distrutto. Queste possono essere sia cellule dell'epitelio retinico pigmentato (ERP) (figg. 1-3) in embrioni di pesci, polli, axolotl (*Ambystoma mexicanus* o salamandra messicana) e di mammiferi e in larve di anfibi, oltre che in *Pleurodeles* adulti (fig. 4), sia precursori specializzati dei bastoncelli nei pesci adulti.

In ambedue i casi, le cellule iniziali vanno incontro a graduale trasformazione, cambiano il loro destino e acquisiscono caratteristiche del neuroepitelio presuntivo (Mitashov, 1986). E' evidente che le cellule iniziali dell'ERP sono differenziate, tuttavia il loro grado di differenziamento varia negli stadi embrionali (rigenerazione della RN in axolotl, tritoni, pesci, pollo e mammiferi), larvali (rane) e in Urodeli adulti (tritoni). Ciò dipende da fattori che controllano direttamente l'espressione genica, da fattori che stabilizzano lo stato differenziale delle cellule, dall'intensità dell'interazione delle cellule e dai contatti tra cellule e substrato. Una glicoproteina (80-200 kDa), prodotta dalle cellule dell'ERP e dell'iride, stabilizza lo stato differenziato di questi tessuti. Un'analoga glicoproteina è stata precedentemente evidenziata nei tessuti degli arti dei tritoni adulti, sia negli spazi intercellulari che sulle membrane cellulari (Mokawa, 1992; Eguchi, 1993). Durante gli stadi iniziali della rigenerazione del cristallino, questa glicoproteina scompare dall'iride dorsale: la sua rimozione abolirebbe lo stato differenziato delle cellule, rendendole capaci di formare un abbozzo di cristallino.

Eventi simili, connessi con la rimozione della glicoproteina stabilizzante, sono stati osservati anche in *Pleurodeles waltl* adulti, negli stadi precoci della rigenerazione degli arti (Eguchi, 1993). In questo tritone, e in esemplari di tritoni adulti di altre specie, le cellule dell'ERP, probabilmente, perdono questa glicoproteina quando si staccano dallo strato cellulare e si spostano nella cavità oculare, dove formano l'abbozzo neuroepiteliale. Cellule neuroepiteliali precoci producono, in *Pleurodeles waltl* adulti, antigeni specifici della linea neurale. Sono stati usati anticorpi specifici per la *glial fibrillar acid protein*[1], per le *neurofilament proteins*[2] e per le *neural cell adhesion molecules*[3] per verificare se le cellule iniziali dell'ERP producono alcuni degli antigeni trovati nella RN normale differenziata (Mitashov, 1993; Markitantova, 1995). I risultati, ottenuti con cellule normali dell'ERP e con cellule negli stadi iniziali di differenziamento, sono stati assolutamente negativi: antigeni specifici per i tessuti neurali compaiono nell'abbozzo neuroepiteliale solo quando questo ha formato un abbozzo retinico

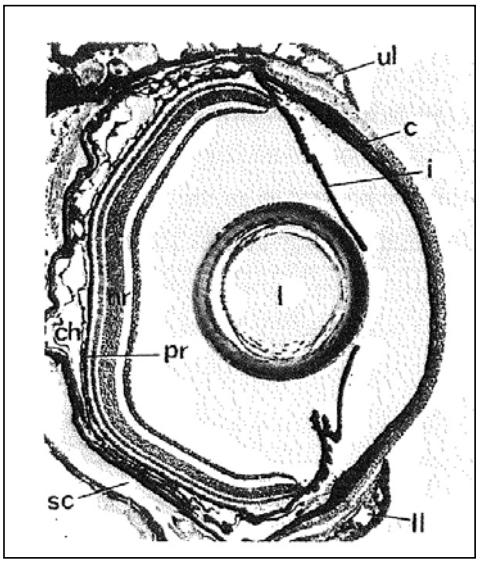


Fig. 1. Preparazione istologica dell'occhio di un tritone adulto; sezione verticale meridionale dell'occhio: cornea (c), cristallino (l), iride (i), RN neurale (nr), epitelio retinico pigmentato (pr), coroide (ch), palpebra inferiore (ll), sclera (sc), palpebra superiore (ul) (da: Reyer, R.W., The amphibian eye: development and regeneration, in: Handbook of Sensory Physiology, Vol. YII/5, part A (Ed. F. Crescitelli), Springer-Verlag, Berlin, pp. 309-390, 1977).

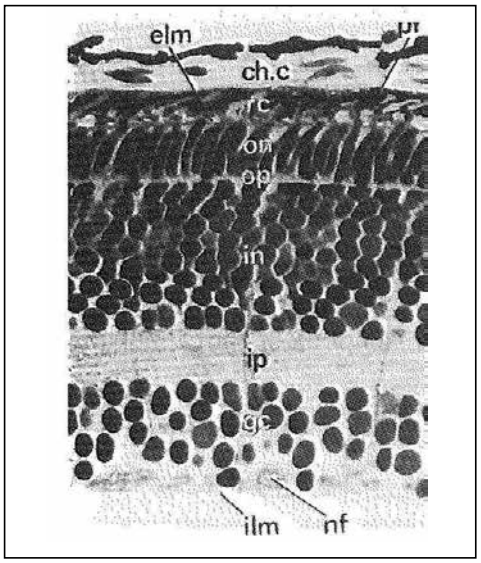


Fig. 2. Preparazione istologica della RN e pigmentata di *Pleurodeles waltl*: membrana limitante interna (ilm), strato delle fibre nervose (nf), strato delle cellule gangliari (gc), strato plessiforme interno (ip), strato nucleare interno (in), strato plessiforme esterno (op), strato nucleare esterno (on), membrana limitante esterna (elm), strato dei coni e bastoncelli (rc), epitelio retinico pigmentato (pr; nel testo: ERP), strato coriocapillare (ch.c) (da: Reyer, R.W., The amphibian eye: development and regeneration, in: Handbook of Sensory Physiology, Vol. YII/5, part A (Ed. F. Crescitelli), Springer-Verlag, Berlin, pp. 309-390, 1977).

depigmentato di 1-2 strati di cellule (Mitashov, 1995). L'espressione di antigeni specifici (ad esempio dell'opsina, proteina attivata quando il retinale, suo antagonista, subisce una modificazione nella conformazione molecolare a seguito dell'assorbimento della luce) è stata rilevata nei primi bastoncelli comparsi dopo la proliferazione delle cellule neuroepiteliali e la formazione di un rigenerato retinico multistratificato.

Ma qual è la situazione dell'ERP in *Pleurodeles waltl* e in tritoni adulti di altre specie, nei quali la RN si rigenera perfettamente? L'esame degli stadi iniziali della rigenerazione della RN, prima della formazione dell'abbozzo neuroepiteliale, in esperimenti di immunochimica con anticorpi contro bFGF (*basic fibroblast growth factor*[4], potente fattore angiogenico e *endothelial cell mitogen*[5]), ha evidenziato un'intensa reazione positiva nell'ERP, nella zona ciliare dell'iride, nella matrice intercellulare e nella coroide e in macrofagi che, dal circolo, entravano nella cavità oculare (Markitantova, 1995). Quindi, nell'ERP e nelle cellule che migrano nella cavità oculare è presente bFGF. I macrofagi circolanti hanno mostrato una

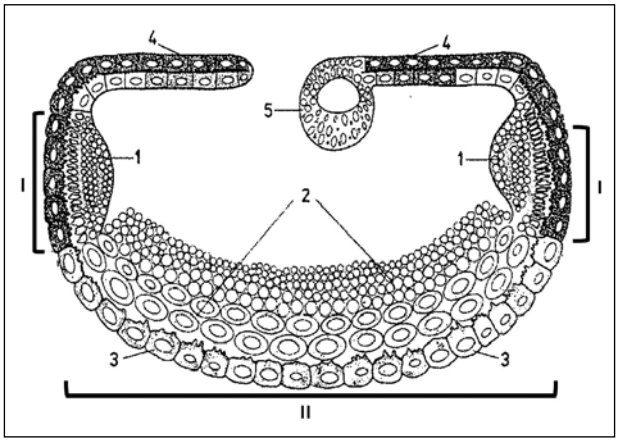


Fig. 3. Disegno schematico della rigenerazione dell'occhio in un tritone adulto: zona priferica (I), parte centrale del fondo dell'occhio (II), abbozzo neuroepiteliale formato dall'ora serrata (1), abbozzo neuroepiteliale (2) formato dalle cellule dell'epitelio retinico pigmentato (ERP), cellule dell'ERP (3), iride (4), cristallino rigenerante (5). In stadi precoci della rigenerazione della RN, tutte le cellule dell'ERP alla periferia dell'occhio incorporano ^{3}H-DOPA (l'indice di marcatura con ^{3}H-timidina è del 4-6%). Durante la formazione dell'abbozzo neuroepiteliale, ^{3}H-DOPA non è incorporata nelle cellule della parte centrale del fondo dell'occhio; la marcatura con ^{3}H-timidina nell'ERP è pari al 40-50%, mentre nell'abbozzo neuroepiteliale è del 70-80%. Le cellule dell'abbozzo neuroepiteliale bistratificato contengono granuli di melanina, perché l'abbozzo si è formato dall'ERP, granuli assenti nell'abbozzo multistratificato (da: Stroeva e Mitashov, 1983)

reazione fortemente positiva alla tenascina[6], glicoproteina adesiva, costituente della matrice extracellulare con *EGF-specific repeats*, che hanno effetto sulla proliferazione cellulare. Un'intensa espressione di molecole bFGF in cellule dell'ERP e, successivamente, anche in cellule dell'abbozzo retinico e nei macrofagi, suggerisce che, in *Pleurodeles waltl,* i fattori di crescita agiscano come sostanze morfogenetiche, determinando cambiamenti nel destino delle cellule dell'ERP. Poiché anche i macrofagi contengono fattori di crescita, la loro interazione con le cellule dell'ERP e con l'abbozzo retinico produce, probabilmente, una secrezione addizionale di fattori di crescita e di altre sostanze che promuovono la conversione dell'ERP in neuroepitelio.

Cellule secernenti del corpo ciliare possono rappresentare un'altra fonte di fattori biologicamente attivi. Anche le cellule dell'ERP producono fattori che stimolano il differenziamento delle cellule neurali (Steele, 1992). Complessivamente, queste evidenze dimostrano che l'ERP può contenere fattori intracellulari responsabili del differenziamento cellulare lungo la linea neurale, che diventa attivata nell'abbozzo neuroepiteliale.

Dati sperimentali supportano il seguente quadro di eventi che portano al trans-differenziamento dell'ERP in cellule dell'abbozzo neuroepiteliale, seguito dalla formazione di una RN differenziata. Lo stadio fondamentale nella rigenerazione retinica è la formazione dell'abbozzo neuroepiteliale, che è una struttura intermedia. Le cellule iniziali dell'ERP cambiano il percorso di differenziamento, dopo aver ricevuto un segnale morfogenetico veicolato da vari FGF e da non identificati fattori endo- ed eso-cellulari, biologicamente attivi; l'intensa proliferazione delle cellule dell'abbozzo neuroepiteliale - stimolata, probabilmente, da sostanze appartenenti a fattori di crescita - guida la formazione di un neuroepitelio multistratificato; cellule del ganglio, degli strati nucleari interno ed esterno e cellule gliali si differenziano sotto l'effetto di fattori prodotti dalle interazioni tra cellule (*cell to cell signals*); ciò porta alla formazione di una RN differenziata. Questo schema, confermato sperimentalmente, riflette

Fig. 4. Crescita di una retina addizionale (2) derivante dall'epitelio retinico pigmentato, dopo il distacco della retina originale (1) in un tritone adulto (da: Grygorian E.R. (2012) Shared Triggering Mechanisms of Retinal Regeneration in Lower Vertebrates and Retinal Rescue in Higher Ones. In: Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application. DOI: 10.5772/25883 · Source: InTech)

la reale sequenza degli eventi che si susseguono durante la rigenerazione della RN in *Plerodeles waltl* adulto, ma anche in altri anfibi, nei pesci, negli uccelli e nei mammiferi in stadi precoci dello sviluppo.

Un ultimo interrogativo riguarda il ruolo della zona di crescita nella rigenerazione della RN. In *Pleurodeles waltl* adulti, e nei pesci, la zona di crescita dipende dal potenziale di crescita dei precursori cellulari situati in questa zona. La proliferazione di queste cellule è controllata da fattori di crescita diffusibili che si trovano nella matrice extracellulare e nell'ERP (Lillien, 1992).

Espressione genica durante la rigenerazione della RN in *Pleurodeles waltl*

Un'altra strategia per identificare i fattori morfogenetici coinvolti nella rigenerazione retinica è l'analisi dell'espressione genica durante il processo rigenerativo.

Numerosi ricercatori hanno studiato l'espressione genica, durante il normale sviluppo dell'occhio, seguendo questo approccio, il cui successo, in questo e in altri ambiti di ricerca, come negli studi sul controllo genetico nello sviluppo individuale, è associato a mutazioni che permettono di identificare *homeobox genes*[7] con funzioni regolatorie note (Heberlein, 1995).

E' stata appurata sperimentalmente la presenza di *master genes* che controllano una cascata di geni responsabili della morfogenesi di quest'organo, così complesso, che è l'occhio. Ma ciò significa che esistono geni coinvolti nella rigenerazione di strutture dell'occhio? Poiché non sono mai state evidenziate mutazioni che interessino i processi rigenerativi, la ricerca sui meccanismi genetici della rigenerazione retinica dovrebbe coinvolgere lo sviluppo di metodi alternativi all'analisi delle mutazioni, per identificare i corrispondenti geni di controllo. Sono due i principali approcci metodologici per identificare geni espressi durante la rigenerazione. Uno prevede la produzione di una *library* di sequenze geniche espresse in strutture in corso di rigenerazione e il suo successivo *screening* con l'uso di sonde note della specie in studio.

In esperimenti sulla rigenerazione degli arti amputati in anfibi, questo approccio ha permesso di tracciare l'espressione di *homeobox genes* e geni codificanti per la cheratina, per i recettori dell'acido retinoico (coinvolto nel meccanismo dell'induzione genica), per la tenascina e per i recettori dell'FGF. Eventi chiave nella rigenerazione di un organo possono essere sotto il controllo di uno specifico *set* di geni privi di omologhi diretti negli elementi

di altri gruppi tassonomici: in questo caso è impossibile identificare questi geni, senza l'uso di metodi specifici per rilevare un'espressione genica differenziale. Un metodo che ha dato buoni risultati nell'identificazione di questi geni è la *subtractive hybridization*[8] di sequenze di cDNA specifiche per cellule di popolazioni differenti: le varie versioni del metodo prevedono la sottrazione di sequenze espresse che sono in comune ai due campioni e il successivo clonaggio (o l'uso come sonda) della frazione di cDNA ricca di sequenze specifiche per un solo campione e, quindi, non coinvolte nella sottrazione.

L'occhio di *Pleurodeles waltl* in corso di rigenerazione è uno di quei rari modelli che si adattano perfettamente a questo tipo di analisi: il confronto tra l'espressione genica nell'ERP, nella RN e in rigenerati retinici, permette di identificare geni specificamente espressi in ognuna di queste strutture. Il cristallino si rigenera dalla parte dorsale dell'iride, non da quella ventrale che, solo in condizioni sperimentali particolari, può funzionare come fonte di cellule per la rigenerazione del cristallino. Gli RNA totali, isolati dalla parte dorsale e da quella ventrale dell'iride di *Pleurodeles waltl* adulti, 14 giorni dopo la rimozione del cristallino, sono stati usati per sintetizzare cDNA "dorsali" e "ventrali", la cui *subtractive hybridization* ha permesso di identificare i geni responsabili del differente potenziale proliferativo di queste due zone dell'iride. Si sono ottenuti due campioni di cDNA amplificato, arricchito con le sequenze specifiche per le rispettive zone dell'iride, che sono stati clonati nel vettore pTZ19R. Ognuna delle due *library* così ottenute conteneva circa 400 cloni, per il 96% ricombinanti. Lo *screening* delle *library*, fatto usando i cDNA "dorsali" e "ventrali" come sonde, ha evidenziato 4 cloni che ibridizzavano prevalentemente con la sonda specifica dell'iride dorsale e 6 cloni che ibridizzavano con la sonda dell'iride ventrale. Un'analisi ulteriore è stata fatta solo su 2 cloni, LeR1 del gruppo dorsale e VeR1 di quello ventrale: la loro caratterizzazione strutturale ha mostrato che contengono inserzioni (rispettivamente 459 e 306 bp) con sequenze dalle regioni 3' del cDNA dei geni corrispondenti. L'analisi delle sequenze delle inserzioni è stata fatta col metodo Sanger[9]; il confronto delle loro sequenze con quelle riportate nel *database* di GeneBank® (*NIH genetic sequence database*) non ha evidenziato omologie significative con sequenze note. Le sequenze studiate sono state chiamate LeR1 (*Lens Regeneration*) e VeR1 (*Ventral Iris during Regeneration*). L'espressione di questi geni durante la rigenerazione è stata studiata analizzando campioni di diversi tessuti dell'occhio con RT-PCR, usando come *primer* specifici *LeR1* e *VeR1*. Cambiamenti tempo-correlati dell'espressione di *LeR1* e *VeR1* si sono verificati durante la rigenerazione del cristallino: attivata negli stadi iniziali della rigenerazione, la loro espressione ha raggiunto valori di picco nel 14° giorno di rigenerazione del cristallino, nelle zone dorsale (*LeR1*) e ventrale (*VeR1*) dell'iride. Inoltre, *LeR1* è attivato durante la rigenerazione della RN, quando l'abbozzo neuroepiteliale consta di 2-3 strati cellulari. I risultati dell'ibridizzazione *Southern* fanno pensare alla presenza, nei genomi di *Pleurodeles waltl* e di *Rana temporaria*, di sequenze complementari a *LeR-1*. L'ibridizzazione del DNA genomico di questi due anfibi, con la sonda di DNA *LeR-1*, ha rivelato la presenza, nei due campioni, di bande identiche di 600 e 800 bp, dimostrando la conservazione evolutiva della sequenza *LeR-1*. In base a questi risultati, l'attivazione di *LeR-1* in *Pleurodeles waltl* adulti potrebbe essere messa in relazione all'innesco della rigenerazione del cristallino, mentre l'attivazione dell'espressione di *VeR-1* in *Rana temporaria* accompagnerebbe l'inibizione dell'attività proliferativa nella zona ventrale dell'iride.

In conclusione, l'analisi dei cloni risultanti dalla *subtractive hybridization* ha mostrato che almeno due cloni contengono sequenze di geni specificamente attivati nel corso della rigenerazione e che questi geni vengono attivati nelle cellule dell'abbozzo neuroepiteliale, negli stadi iniziali della rigenerazione della RN (Kazanskaja, 1995; Mitashov, 1996).

Il *fibroblast growth factor 2* (Fgf2) appartiene alla superfamiglia di proteine che hanno un'alta affinità per recettori con attività tirosina chinasica, che modulano l'attività funzionale in diversi tipi cellulari. Essendo una *signal secreted protein* con effetto mitogeno, Fgf2 gioca un ruolo

chiave nel controllo dei processi dello sviluppo e stimola l'angiogenesi e la cicatrizzazione delle ferite. Per quanto riguarda i tessuti dell'occhio, è noto che le funzioni di Fgf2 e di altri membri di questa famiglia sono coinvolte nella morfogenesi, nella guarigione dei danni tissutali, nel mantenimento della proliferazione e della vitalità cellulare e nella prevenzione dell'apoptosi.

Ricerche con modelli di RN in sviluppo di vertebrati, hanno mostrato che l'acquisizione del fenotipo neurale da parte delle cellule dell'ERP può essere indotta tramite l'attivazione costitutiva di mediatori della *pathway* di segnalazione di Fgf2 (ad esempio *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)). E' stato dimostrato che esiste un nesso tra Fgf2 e il *Microphthalmia transcription factor*[10], che controlla il differenziamento e la funzione dell'ERP. L'individuazione dell'mRNA di Fgf2 nella RN e nell'ERP di ratti e il considerevole aumento dell'espressione della proteina Fgf2 nel sito della lesione, implica il coinvolgimento di Fgf2 nella cicatrizzazione dei tessuti dell'occhio. Il coinvolgimento della superfamiglia di proteine Fgf, e in particolare di Fgf2, nella rigenerazione epimorfica[11] è stato dimostrato in modo attendibile in modelli di ripristino del cristallino, dell'arto e della coda amputata del tritone. La regolazione del processo di rigenerazione è effettuata, molto probabilmente, da una cascata MEK (*mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/*extracellular signal-regulated kinase (ERK)-kinase*)) attivata da Fgf2 nel tritone adulto giapponese *Cynops pyrrhogaster* e in larve di anfibi anuri. L'inibizione dell'azione di Fgf2 nel processo di trans-differenziamento, ottenuta separando l'ERP dalla sottostante coroide (fonte presunta di Fgf2) o con inibitori chimici di MEK, conferma il coinvolgimento della *pathway* di Fgf2 nel processo di conversione delle cellule dell'ERP in neuroni e glia, come già visto *in vitro* con espianti dell'ERP di *Xenopus laevis* (anfibio anuro) in presenza di Fgf2 nel *medium* di coltura. E' stata dimostrata l'espressione del gene *fgf2* (insieme a geni codificanti per vari fattori di trascrizione) in tessuti dell'occhio di *Pleurodeles waltl* normale e in stadi relativamente tardivi della rigenerazione retinica. L'attivazione dell'espressione genica di *fgf2* è accompagnata dalla *up-regulation* dei geni neurospecifici *Pax6*[12] e *Six*[13], e dalla soppressione dell'espressione dei geni *Otx2*[14] e *RPE65*[15], allo stadio di transizione della popolazione di neuroblasti del primordio della RN rigenerante.

Recentemente sono stati individuati gli elementi della *pathway* di segnalazione di FGF2 in tessuti della parete posteriore dell'occhio normale e di quello rigenerante di *Pleurodels waltl* adulto. L'espressione del gene *fgf2* è stata rilevata, mediante PCR, nella RN, nell'ERP e nella coroide. E' stata dimostrata un'elevata omologia della sequenza nucleotidica dell'mRNA della regione più conservativa del gene *fgf2* di questo tritone, con quella degli *fgf2* ortologhi in altri vertebrati. La sequenza amminoacidica della proteina Fgf2 di *Pleurodeles waltl* mostra un'omologia perfino maggiore con questo fattore di crescita in altri vertebrati. La proteina Fgf2, con massa molecolare di 35 kDa, è stata identificata, mediante *Western blot,* in tessuti dell'occhio di *Pleurodeles waltl*. Ricorrendo all'immunoistochimica, è stato possibile localizzare questa proteina e i suoi recettori (Fgfr) nell'ERP, nella coroide, nella regione centrale e in quella di crescita della RN dell'occhio nativo di questo tritone, e nel ciglio connettivo dei fotorecettori (connette il segmento esterno fototrasduttivo della cellula al segmento interno). Ricorrendo a tecniche di *real-time* PCR e di immunoistochimica, è stato dimostrato che precocemente - già 4-8 giorni dopo la rimozione della RN - rispetto a quanto accade nello stesso compartimento dell'occhio non operato, si registrano *down-regulation* del gene *fgf2* e diminuzione dell'intensità della reazione immunochimica del suo prodotto proteico (Fgf2) (Markitantova, 2014).

Risorse interne di rigenerazione della RN dopo distacco sperimentale

Le "risorse interne" di rigenerazione della RN sono state studiate usando un modello sperimentale di distacco della RN in *Pleurodeles waltl* adulti. Cambiamenti nella morfologia, nella localizzazione, nel comportamento e nella quantità delle cellule dei vari strati retinici

sono stati studiati in sezioni semifini e ultrafini di campioni di RN prelevati a tempi diversi dall'operazione di distacco chirurgico. E' stata individuata una nuova classe di cellule nello strato nucleare esterno, diverse dai fotorecettori, ma con un certa somiglianza morfologica con le cellule bipolari[16] nello strato nucleare interno, che hanno un *Landolt's club process*[17]. Queste cellule, chiamate *bipolar-like cells*, ammontano a circa il 10-12% delle cellule presenti nello strato nucleare esterno e sono in grado di produrre nuovi fotorecettori durante il recupero della RN, dopo il suo distacco. E' stato ipotizzato che le cellule bipolari con il *Landolt's club process* dello strato nucleare interno, che sono spostate verso la sclera dopo la morte di una parte dei fotorecettori, siano una fonte di *bipolar-like cells* dello strato nucleare esterno. Presumibilmente, queste cellule originano anche neuroblasti, rinvenuti in fasi successive, dopo il distacco, nel caso di una più massiva distruzione degli strati nucleari della RN. I neuroblasti che compaiono nello strato nucleare interno sono spostati apicalmente e si dividono a formare inserti radiali, le cui cellule si differenziano, ripristinando la composizione cellulare di tutti e tre gli strati nucleari della RN staccata. Le risorse interne di rigenerazione della RN individuate in *Pleurodeles waltl*, sono state confrontate con quelle note nei pesci, precursori cellulari dei bastoncelli, ed è stato descritto il ruolo di altri tipi cellulari nella rigenerazione della RN nelle determinate condizioni del danno inferto (Grigoryan, 1996).

In studi successivi sulle fonti interne di rigenerazione della RN, è stata fatta una ricerca autoradiografica in *Pleurodeles waltl* per visualizzare cellule proliferanti in aree diverse della RN e a differenti tempi dal suo distacco. L'analisi di sezioni seriali semisottili standard ha evidenziato parecchi tipi di cellule capaci di incorporare ^{3}H-timidina, precursore radiomarcato della sintesi di DNA. Questo *marker* di proliferazione cellulare è stato incorporato nelle cellule gliali di Müller[18] che, poste tra i neuroni, si allungano tra gli strati, nella glia epiteliale pigmentata, nelle cellule dell'ERP, in quelle della zona di crescita e in piccole cellule neurali della parte vitrea dello strato nucleare interno. Una fonte di formazione di "inserzioni" neuroepiteliali, responsabili del ripristino della completa composizione cellulare della RN danneggiata, dovrebbe trovarsi tra questi tipi cellulari. Tuttavia, tra le cellule in proliferazione marcate con ^{3}H-timidina, non sono state rinvenute né cellule bipolari, con il *Landoldt 's club process* nello strato nucleare interno, né *bipolar-like cells* nello strato nucleare esterno, che sono fonti di formazione di fotorecettori supplementari.

In conclusione, le *bipolar-like cells* di *Pleurodeles waltl* sono cellule post-mitotiche che non hanno raggiunto il differenziamento terminale (Grigoryan, 1999).

Localizzazione e accumulo di cellule in fase S nella RN, dopo distacco dell'ERP

Il distacco neurochirurgico della RN, in *Pleurodeles waltl* adulto, si è confermato modello sperimentale valido anche in un altro studio sulle cellule retiniche in grado di proliferare nell'occhio dei vertebrati inferiori. Esperimenti hanno mostrato che la RN rimane vitale durante i 2 mesi successivi al distacco chirurgico. Autoradiografie di sezioni seriali semifini, fatte a periodi diversi dal distacco della RN, hanno permesso di identificare vari tipi cellulari capaci di incorporare il precursore triziato della sintesi di DNA (^{3}H-timidina, analogo della bromodesossiuridina, BrdU). Cellule in fase S (fase del ciclo cellulare di duplicazione del materiale genetico) sono state individuate nella zona dell'occhio in crescita, in macroglia e microglia e nella fila vitreale di interneuroni. Questa ricerca si è avvalsa di un modello sperimentale di distacco della RN dall'epitelio pigmentato e di due metodi per saturare i tessuti oculari *in vivo* con precursori della sintesi di DNA: il primo metodo consiste in ripetute marcature con ^{3}H-timidina e successive analisi autoradiografiche di sezioni ultrasottili della RN, prese a tempi diversi dall'operazione chirurgica; il secondo metodo è una tecnica originale di marcatura continua con BrdU, e successivo rilevamento immunochimico.

I risultati confermano, e ampliano, dati precedentemente ottenuti sulla localizzazione delle cellule in attiva sintesi di DNA nella RN e evidenziano il *pattern* dell'addensamento di cellule in fase S dopo il distacco della RN per ogni popolazione cellulare competente per proliferazione. Oltre alle cellule nella zona di crescita della RN, alle cellule macrogliali di Müller (cellule di sostegno dei neuroni della RN), alla microglia e a una popolazione minore di cellule nella parte vitrea degli interneuroni, le cellule in corso di sintesi di DNA comprendevano astrociti del nervo ottico e cellule della sua rete vascolare. Quattro settimane dopo il distacco della RN, il numero delle cellule in fase S nella zona di crescita arrivava al 15-20%, mentre le cellule in sintesi attiva di DNA nella RN differenziata avevano un basso ritmo di riproduzione e potevano dare origine a una sola generazione di cellule nello stesso intervallo di tempo (Novikova. 2008).

Conclusioni

In questa breve e, per certi versi, incompleta rassegna in due parti, sono stati riassunti dati desunti dalla letteratura sui primi eventi cellulari e molecolari che si verificano dopo il distacco della RN dall'ERP nell'occhio dei vertebrati.

Negli anfibi urodeli in generale e, in particolare, in *Pleurodeles waltl*, la disintegrazione del complesso NR↔ERP porta alla formazione di una nuova RN grazie al trans-differenziamento delle cellule dell'ERP in cellule della RN. Nei mammiferi, invece, il distacco della RN innesca una patologia retinica. Un confronto tra questi due opposti destini rivela, inaspettatamente, somiglianze nelle cellule iniziali e nei processi molecolari indotti dalla separazione della RN dall'ERP. In ambedue i casi, infatti, si possono riscontrare alterazioni dei contatti delle cellule dell'ERP, cambiamenti del citoscheletro e della composizione della matrice extracellulare, insieme ad alterazioni della circolazione del sangue e del sistema immunitario. Queste alterazioni portano alla destabilizzazione del tipo cellulare dell'ERP, alla trasformazione del fenotipo, alla ritrazione delle cellule dallo strato e alla loro migrazione. Parallelamente, ha luogo una *down-regulation* dell'espressione delle molecole coinvolte nel ciclo visivo. Al contrario, le *heat shock proteins*, la *pathway* di segnalazione di FGF, i geni della risposta immediata iniziale e il complesso AP-1 dimostrano una *up-regulation*. In tutti i vertebrati, uomo compreso, questi eventi associati al distacco della RN rappresentano un *range* di risposte, limitato e universale, delle cellule retiniche allo stress. Tra queste, lo sdifferenziamento dell'ERP, la proliferazione e migrazione delle cellule sembrano molto importanti sia per la successiva rigenerazione epimorfica della RN negli anfibi, sia per il processo progressivo del distacco indotto dalle patologie oculari nei mammiferi.

Note

Nota 1. La proteina fibrillare acida della glia (*glial fibrillar acid protein*, GFAP) è la denominazione istologica con la quale viene indicata l'unità proteica essenziale da cui sono costituiti i filamenti intermedi di tipo III degli astrociti.

Nota 2. Il neurofilamento è una struttura citoscheletrica caratteristica dei neuroni di cui costituisce l'architettura neurofibrillare di sostegno.

Nota 3. La *neural cell adhesion molecule* (NCAM) è una glicoproteina espressa sulla superficie di neuroni, cellule gliali, muscolari scheletriche e cellule *natural killer*. NCAM ha un ruolo nell'adesione cellula-cellula, nella crescita dei neuriti, nella plasticità sinaptica, nei processi di memoria e apprendimento.

Nota 4. I Fibroblast growth factors (FGF) sono molecole secrete che funzionano grazie l'attivazione di specifici tirosina chinasi, i recettori FGF (FGFr) che trasducono il segnale attivando diverse *pathway*, incluse la Ras/Map chinasi e i *pathway* della fosfolipasi C-gamma. Gli FGF sono implicati nella regolazione di molti processi dello sviluppo, incluse morfogenesi, differenziamento, proliferazione e migrazione cellulari.

Nota 5. L'*endothelial cell mitogen* è un fattore di crescita mitogeno per le cellule vascolari endoteliali. E' una proteina di 46 kDa di massa molecolare, dimero composto da due sub-unità di pari massa molecolare.

Nota 6. *Tenascin* è una glicoproteina adesiva, costituente della matrice extracellulare. Essa è abbondante nella matrice extracellulare degli embrioni dei vertebrati durante il loro sviluppo e riappare nelle ferite in guarigione e nello stroma di alcuni tumori, oltre che in alcuni tipi di tessuto cartilagineo.

Nota 7. *Homeobox genes* sono una grande famiglia di geni simili tra loro, che dirigono la formazione di molte strutture del corpo durante lo sviluppo. I geni della famiglia *homeobox* sono coinvolti in un ampio *range* di attività critiche durante lo sviluppo: sovrintendono alla formazione degli arti e degli organi lungo l'asse anteroposteriore e regolano il processo attraverso il quale le cellule maturano per assumere funzioni specifiche (differenziamento).

Nota 8. La *subtractive hybridization* è una potente tecnologia che permette di confrontare due popolazioni di DNA e di isolare una popolazione arricchita in molecole differenzialmente distribuite, per studiare l'espressione genica in tessuti specifici o in cellule a stadi specifici. Permette di amplificare, usando la PCR, frammenti di un unico cDNA, che differiscono tra un controllo (*driver*) e un trascrittoma sperimentale. Il cDNA è prodotto a partire dall'mRNA.

Nota 9. Frederick Sanger (1918-2013), due volte Premio Nobel per la Chimica: nel 1958, per un metodo di determinazione della struttura delle proteine, e di quella dell'insulina in particolare, e nel 1980 per lo sviluppo della prima tecnica per il sequenziamento del DNA: il DNA è replicato in presenza di versioni chimicamente modificate delle 4 basi A, T, C e G. Queste basi bloccano il processo di replicazione quando sono incorporate nei filamenti di DNA di neoformazione, che risultano, così, di varie lunghezze e che vengono ordinati per dimensione. Leggendo le lettere finali, a partire dal filamento più breve a quello più lungo, si ottiene la sequenza completa del DNA di interesse.

Nota 10. *Microphthalmia transcription factor* è un fattore di trascrizione nucleare, critico per lo sviluppo e la sopravvivenza dei melanociti, ed è un *marker* sensibile e specifico per campioni istologici di melanoma.

Nota 11. Rigenerazione epimorfica o epimorfòsi è una tipologia di rigenerazione patologica o recuperativa, in cui alla formazione della nuova parte non partecipano i tessuti preesistenti, ma la parte si rigenera, identica a quella danneggiata, da materiale interamente neoformato, utilizzando tessuto indifferenziato e facendolo proliferare.

Nota 12. *Pax6* è un gene regolatore chiave dello sviluppo dell'occhio e del cervello. Nella sua qualità di fattore di trascrizione, attiva e/o disattiva *pattern* di espressione genica per assicurare un corretto sviluppo del tessuto: topi *knockout* per questo gene sono privi di occhi o hanno occhi molto sottosviluppati.

Nota 13. *Six* fa parte di un gruppo di geni simili, noti come *Six gene family*. I geni di questa famiglia forniscono istruzioni per la produzione di proteine che legano il DNA e controllano l'attività di altri geni.

Nota 14. *Otx2* è un gruppo di *homeobox genes* tipicamente descritti come organizzatori principali durante il *primitive streak stage* (struttura che si forma nella blastula) dello sviluppo embrionale. I geni di questo gruppo influenzano la formazione degli organi sensitivi (orecchio interno e nervo ottico) e contribuiscono ad assicurare l'integrità della RN.

Nota 15. Il gene *RPE65* codifica per una proteina di 65 kDa, localizzata nell'ERP, implicata nella conversione di 11-trans-retinol in 11-cis retinal, durante la fototrasduzione e nella rigenerazione del pigmento visivo.

Nota 16. Le cellule bipolari sono gli interneuroni chiave della RN. Ci sono cellule bipolari tra i fotorecettori (coni e bastoncelli) e le cellule gangliari. Agiscono, direttamente o indirettamenete, per trasmettere segnali dai fotorecettori alle cellule gangliari.

Nota 17. Il *Landolt's club process* è stato studiato nella RN di *Pleurodeles waltl* adulto. In preparazioni di Golgi, è stato dimostrato che questo processo origina dal tronco dendritico di una cellula bipolare, passa attraverso lo strato esterno sinaptico senza usare una sinapsi e termina come un bulbo allargato a livello della zona funzionale esterna.

Nota 18. Le cellule gliali di Müller sono le principali cellule gliali della RN; proteggono e conservano lo stato funzionale ottimale dei fotorecettori, captando glucosio, secernendo fattori neurotrofici quali il CNTF (*ciliary neurotro-*

phic factor) e partecipando alla costituzione di una struttura di filtro protettivo simile alla barriera emato-encefalica, denominata barriera emato-retinica (*blood-RNl barrier*, BRB).

Bibliografia

- Eguchi, G., 1993; Lens transdifferentiation in the vertebrate RNl pigmented epithelial cells. Prog. Ret. Res., vol. 12: 206-230
- Grigoryan, E. N., et al., 1996; The Discovery of New Internal Sources of Neural RNl Regeneration after its Detachment in Newts. Morphological and Quantitative Research, Izvestiya Ross. Akad. Nauk. Ser. Biol., no. 3: pp. 319-332
- Grigoryan, E. N. and Poplinskaya, V. A., 1999; Discovery of Internal Sources of the Neural RNl Regeneration after its Detachment in Pleurodeles. II. The Radioautography Study, Izvestiya Ross. Akad. Nauk. Ser. Biol., 1999, no. 5: pp. 583–591.
- Heberlein, U., et al., 1995; Growth and differentiation in a Drosophila eye coordinated by hedgehog. Nature, vol. 373: pp. 709-711
- Kazanskaja, O. V., et al., 1995: Identification of new genes and analysis of their expreession durin lens and RNl regeneration in adult newts. Izvestiya Ross. Akad. Nauk. Ser. Biol., vol. 3: pp. 271-275
- Lillien, L., and Cepko, C. L., 1992; Control of proliferation in the RN: temporal changes in responsivness to EGF and TGFa. Development, vol. 115: pp. 253-266
- Markitantova, Y., et al., 1995; Expression of specific and glial proteins and biological active factors during RNl regeneration in adult newt. Wound Repair Regeneration, vol. 3: p. 112 (Abstr.).
- Markitantova. Yu. V., et al., 2014; FGF2 Signaling Pathway Components in Tissue of the Posterior Eye Sector in the Adult Newt Pleurodeles waltl. Biology Bulletin, vol. 41: pp.297-305
- Mitashov., V. I., et al., 1993; Study of lens and neural RN regeneration in adult newt using antibodies against laminin, fibronectin, tenascin, GFAP, N-CAM and bFGF. In: Int. Soc. Dev. Biol. 12th Intern. Congress Abstract Book. Vienna, p. 25
- Mitashov, V. I., et al., 1995; Remodeling processes during neural RN regeneration in adult urodeles: an immunohistochemical survey. Int. J. Dev. Biol., v. 39: pp.993-1003
- Mitashov, V. I., 1996; Mechanisms of neural regeneration in urodeles. Int. J. Dev. Biol., vol 40: pp. 833-844
- Mokawa, Y. and Eguchi, G., 1992; Expression and distribution of regeneration responsive molecule during normal development of the newt. Int. J. Dev. Biol., vol. 36: pp. 407-412
- Novikova, YU. P., 2008; A study of the localization and accumulation of S-phase in the RN of newt Pleurodeles waltl after experimental pigment epithelial detachment. Russian Journal of Developmental Biology, vol. 39: pp. 116-121
- Steele, F. R., et al., 1992; Pigment epithelium-derived factor: Neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90: pp. 1526-1530
- Stroeva, O. G., and Mitashov, V. I., 1983; RNl pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration. Int. Rev. Cytol, vol. 83: pp. 221-293

CHRYSEMIS PICTA BELLII, TARTARUGA MODELLO ANIMALE PER RICERCHE SULLA SALUTE UMANA, IN STUDI EVOLUZIONISTICI, DI GENETICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA E DI PLASTICITÀ FENOLOGICA

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini,
Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Tassonomia, areale geografico e biologia di *Chrysemis picta*

Narra la mitologia greca che la ninfa Chelone (Χελώνη), non essendosi presentata alle nozze di Zeus ed Era, alle quali era stata invitata, per punizione fu precipitata da Hermes in un fiume, insieme alla sua casa, e trasformata in un rettile condannato a portarsi per sempre la casa sulle spalle. Tuttora, Chelone, in greco, significa tartaruga e Chelonia è l'ordine che comprende i rettili comunemente noti come tartarughe o testuggini. Il paleontologo e biologo americano, Alfred Romer (1894-1973), studioso dell'evoluzione dei vertebrati, sosteneva che *"I Chelonia sono i rettili più strani e conservativi, che noi consideriamo animali comuni perché sono tuttora viventi, ma che, se fossero estinti, sarebbero per noi motivo di grande stupore."*

La tassonomia ci dice che l'ordine dei *Chelonia* o *Testudines* (Linnaeus,1758) comprende specie acquatiche, le tartarughe (*turtle*), e specie terrestri, le testuggini (*tortoise*), suddivise in 75 generi e 220 specie. Questi animali sono un vero e proprio enigma vivente: comparsi 210 milioni di anni or sono, alla fine del triassico, sono i rettili viventi più antichi, anche più dei dinosauri estinti, e si sono mantenuti morfologicamente conservativi fino ai nostri giorni, tanto che, persino quelli più antichi, sono riconoscibili già a prima vista. Tartarughe e testuggini sono, infatti, caratterizzate da aspetti morfologici e fisiologici tipici ed esclusivi dei Chelonia. Oltre al caratteristico guscio, vivono molto a lungo; spesso sono sessualmente attive ancora in età molto avanzata; il sesso è determinato dalla temperatura di incubazione delle uova, sono i tetrapodi più resistenti all'ipossia e gli individui di alcune specie hanno la capacità di congelare fin quasi a diventare solidi, di scongelarsi e di sopravvivere, riportando solo trascurabili danni tissutali. Come si vedrà successivamente, il genoma di *Chrysemis picta* contiene molte informazioni sulle basi genetiche di queste caratteristiche e di altri adattamenti esclusivi di questo straordinario ordine di vertebrati.

Chrysemis picta (Genere: *Crysemys*, Specie: *Chrysemys picta*) è la più diffusa e comune tartaruga del Nord America, presente dalle coste atlantiche a quelle dell'Oceano Pacifico. In natura, si trova in gran parte del sud del Canada, negli Stati Uniti e nel Messico e conta 4 sottospecie regionali, differenti per aspetto, habitat e dieta alimentare, sebbene i confini delle rispettive aree distributive si sovrappongano e, alle periferie, vivano popolazioni ibride. *Chrysemis picta bellii* è la sottospecie più diffusa e colorata; le altre sono *Chrysemis picta dorsalis*, *Chrysemis picta marginata* e *Chrysemis picta picta*. Quest'ultima, come indica il nome, presenta tutte le caratteristiche morfologiche distintive della specie. *Chrysemis picta bellii*, (figg. 1,2), chiamata anche *western painted turtle*, che in seguito chiameremo *Chrysemis picta*) è la sottospecie col guscio più ricco di colori e con un vistoso disegno rosso sul piastrone ventrale (fig. 3). Il carapace (corazza o guscio dorsale) come nelle altre sottospecie, è scuro, liscio e, negli individui adulti, misura 10-25 cm nella femmina (p.m. 500 g) e 7-15 cm nel maschio (p.m. 300 g). Il colore della pelle va dall'olivastro al nero, con strisce rosse, arancioni o gialle su collo, arti e coda. Una grande striatura gialla (fig. 2) si estende da un occhio all'altro e le zampe sono palmate, con artigli. I maschi raggiungono la maturità sessuale

Fig. 1. *Chrysemis picta bellii* (da: pinterest.com)

Fig. 2. *Chrysemis picta bellii* (da: Theobligatescientist.blogspot.com)

a 2-9 anni di età e le femmine, più tardive, a 6-16 anni; in natura possono vivere più di 40 anni (Taking the temperature of the painted turtle, 2013). Sono rettili onnivori che, in età adulta, si cibano prevalentemente di vegetali e piccoli animali, sia vivi che morti. Abitano acque fresche, basse, ferme o in lento movimento, come paludi e acquitrini, ricche di vegetazione, con tronchi e rami spezzati e rocce emergenti dall'acqua, sulle quali salgono e sostano per scaldarsi al sole, e in fondali fangosi, melmosi, soffici e ricchi di vegetazione, dove si nascondono, cacciano, nidificano e vanno in ibernazione, durante i rigidi inverni. Possono vivere anche in acque salmastre, vicine alla costa e ben soleggiate.

Chrysenis picta bellii modello animale in ricerche sulla salute umana

Intrappolata sotto il ghiaccio, nel fango o in acque prive di ossigeno, *Chrysemis picta* va in ibernazione e smette di respirare, ma grazie ad adattamenti del sangue e del cervello, del cuore, del carapace e dello scheletro, supera indenne il lungo periodo trascorso nella più assoluta anossia (Jackson, 2002). Per sopravvivere in queste condizioni estreme, questi animali devono non solo preservare le funzioni vitali in un ambiente privo di ossigeno, ma anche resistere, durante i gelidi mesi invernali, in un habitat climaticamente inospitale. Sono due le principali risposte fisiologiche adattative alla base della loro capacità di sopravvivere, per così lunghi periodi, in condizioni ai limiti della vita (Jackson, 2002). La prima è la depressione coordinata

Fig. 3. *Chrysemis picta*: piastrone ventrale (da: dreamstime)

dei processi metabolici endocellulari, in particolare di quelli della via glicolitica che produce ATP (in anaerobiosi, una molecola di glucosio è scissa in due molecole di acido piruvico, per generare 2 molecole di ATP e 2 di NADH, a più alta energia); a ciò si aggiunge la depressione di processi cellulari, come le pompe ioniche, che consumano ATP. Così, sia il tasso di deplezione del substrato (glucosio) sia il tasso di produzione, in anaerobiosi, di acido lattico sono notevolmente rallentati. La seconda risposta fisiologica adattativa consiste nello sfruttamento delle ampie capacità tampone, proprie del carapace e dello scheletro di questa tartaruga, di neutralizzare grandi quantità di acido lattico che, eventualmente, si accumulassero durante l'ibernazione. In questa funzione sono coinvolti due meccanismi distinti propri del carapace: il rilascio di tamponi carbonato e l'uptake di acido lattico: così, l'acido è sequestrato e il pH acido viene tamponato. Questi meccanismi, quello metabolico e quello di tamponamento del pH acido/*uptake* di acido lattico, permettono a *Chrysemis picta* di sopravvivere per 3-4 mesi in completa anossia e con livelli ematici di acido lattico pari a 150 mmoli/Lt o più (Jackson, 2002).

All'inizio della primavera, quando la temperatura dell'acqua sale a 15-18°C, queste tartarughe escono dall'ibernazione e, allorché la temperatura corporea raggiunge i 17°C, nel maschio inizia la produzione di sperma (Ernst, 2009). Nel corteggiamento rituale, il maschio si pone di fronte alla femmina, fa ondeggiare le lunghe zampe artigliate attorno alla testa e poi gliele strofina sul muso e sul collo; la femmina, se è ricettiva, contraccambia il corteggiamento accarezzandogli le zampe anteriori (Ernst, 2009). Dopo l'accoppiamento, che avviene tra la primavera avanzata e il solstizio d'estate, la femmina lascia l'ambiente acquatico per cercare un luogo adatto alla preparazione del nido; spesso torna per vari anni a nidificare nello stesso luogo (Ernst, 2009).

Effetti della temperatura sulla deposizione e schiusa delle uova

La temperatura ambientale può influire sul momento scelto dalla femmina per nidificare. Quando la temperatura corporea raggiunge i 29-30°C, essa scava, con le zampe posteriori, un nido sotterraneo di 8-14 cm, nel quale deposita 4-12 uova che copre con strati di terra e fango. Dopo 72-80 giorni di incubazione, a fine estate o a inizio autunno, le uova si schiudono. Il sesso delle tartarughe neonate è determinato dalla temperatura raggiunta dal nido durante il terzo centrale del periodo di incubazione, una finestra temporale compresa tra il 24°-27° e il 48°-54° giorno dalla deposizione delle uova (Ernst, 2009; Schwarzkopf, 2002). Studi, in laboratorio e sul campo a temperature costanti e fluttuanti, hanno dimostrato che, da uova incubate a 30 e 32°C costanti, nascono solo femmine, mentre da uova incubate a 22, 24 o 26°C nascono solo maschi. Da uova incubate a 20 e a 28°C nascono tartarughe di ambedue i sessi. Le temperature soglia, che producono nidiate col 50% di maschi, sono stimate a 20 e a 27,5°C (Schwarzkopf, 1985).

Non tutte le tartarughe neonate lasciano il nido subito dopo la nascita per dirigersi verso i vicini stagni, paludi o acquitrini: alcune, soprattutto nelle popolazioni nordiche (Nebraska, nord dell'Illinois, New Jersey e sud del Canada) rimangono nel nido per tutto il primo inverno di vita ed emergono all'inizio della primavera successiva, quando il fango ghiacciato che ospita il nido si scioglie (Packard, 1996). Per resistere a temperature invernali (-10°C e oltre) ben inferiori al punto di congelamento, le tartarughe neonate entrano in uno stato di "superraffreddamento", nel quale la sopravvivenza è possibile solo grazie a meccanismi adattativi dei liquidi corporei e della cute: i primi, privi dei nuclei di condensazione (*nucleating agents*) che promuovono il passaggio dei liquidi corporei dalla fase liquida a quella solida, rimangono allo stato liquido, mentre la cute si oppone alla penetrazione dei cristalli di ghiaccio dal terreno ghiacciato ai compartimenti corporei (Packsrd, 1996; Packard, 2002). Tuttavia, in par-

ticolare nel nord dell'Illinois, parte delle giovani tartarughe gelano e muoiono mentre, nella stragrande maggioranza, grazie alla strategia adattativa che favorisce lo stato di "super-raffreddammento", non gelano e sopravvivono (Packard, 1996). Curiosamente, le giovani tartarughe che vivono in questa regione sono meno tolleranti al gelo delle sorelle del Nebraska: questa differenza si spiega col fatto che parte della popolazione del nord ha dei nuclei eterogenei di condensazione nei fluidi corporei che causano un limite assoluto di tolleranza al gelo e di iniziale surgelamento, a circa -6÷-8°C (Packard, 1996).

Evoluzione della fisiologia dell'estremo adattamento ai cambiamenti della temperatura

Grazie a questi adattamenti e sensibilità alla temperatura, esclusivi di *Chrysemis picta* e di poche altre specie, queste tartarughe sono state studiate per decifrare le basi evoluzionistiche dell'adattamento ad ambienti estremi e le implicazioni ecologiche dei cambiamenti climatici (Valenzuela, 2009).

Chrysemis picta rappresenta un *clade* - gruppo di organismi che originano da un unico antenato ancestrale - la cui biologia e posizione filogenetica forniscono la chiave per comprendere gli aspetti fondamentali dell'evoluzione dei vertebrati. Queste caratteristiche fanno di questa piccola tartaruga un modello animale ideale per studi evoluzionistici (Valenzuela, 2009). Ricerche ad ampio raggio di ecologia e fisiologia forniscono il contesto nel quale collocare le nuove scoperte fatte, in questo modello sperimentale, dalla genetica dell'evoluzione, dalla genomica, dalla biologia evolutiva dello sviluppo e dall'ecologia dello sviluppo. Tali scoperte sono state possibili grazie alle attuali risorse tecnologiche, quali la *library* cromosomica batterica artificiale (BAC *library*) di *Chrysemis picta*, che consente di produrre librerie genomiche con frammenti relativamente grandi di DNA, usate nel sequenziamento genico, e lo sviluppo di altre librerie, come le sequenze genomiche, le library di cDNA e le EST (*Expressed Sequence Tags*), che rappresentano porzioni di mRNA usate per individuare geni espressi, tramite un'analisi sistematica del trascrittoma.

Questo approccio integrato permetterà di progredire nella comprensione, dal punto di vista evoluzionistico, della labilità dei tratti biologici trovati non solo tra i rettili, ma diffusamente anche tra i vertebrati. Inoltre, poiché uomini e rettili condividono un comune capostipite ancestrale e data la maggior facilità di usare, in biologia sperimentale, vertebrati privi di placenta rispetto a embrioni di mammifero, *Chysemis picta* è un modello animale emergente nella ricerca biomedica.

Queste tartarughe sono state studiate anche per comprendere molte risposte biologiche allo svernamento e all'anossia, e interpretarle come potenziali sentinelle per rivelare la presenza di xenobiotici ambientali e come modello per decifrare l'ecologia e l'evoluzione del loro sviluppo sessuale e della loro funzione riproduttiva.

Esse rappresentano un modello animale senza valide alternative per lo studio dei meccanismi naturali che proteggono cervello e cuore dai danni indotti dall'ipossia (Valenzuela, 2009). Infarto del miocardio e ischemia cerebrale sono la prima e la terza causa di morte negli USA e in Europa e, mentre le terapie convenzionali allungano la durata della vita umana, i progressi nel migliorarle ulteriormente sono molto limitati e lenti.

L'analisi genomica indica che *Chrysemis picta* spesso espleta le sue estreme funzioni fisiologiche utilizzando, almeno in parte, percorsi molecolari conservati a livello amniotico; l'analisi funzionale di tali p*athway*, in questa e in altre specie di tartarughe con funzioni fisiologiche variabili può quindi fornire informazioni importanti per la prevenzione di gravi patologie umane.

In conclusione, *Chrysemis picta* è un eccellente sistema modello di rettile, per studi sulla salute umana e sull'importanza dei fattori ambientali, ecologici ed evoluzionistici (Valenzue-

la,2009). L'analisi delle sequenze genomiche di *Chrysemis picta* ha permesso di identificare vari geni coinvolti nella sua esclusiva fisiologia. Poiché alcuni di questi geni sono implicati anche in patologie umane, un'ulteriore e più approfondita analisi di queste *pathway* in *Chrysemis picta* potrà contribuire a una migliore comprensione e a più efficaci strategie terapeutiche per la loro cura (Shaffer, 2013). Il genoma di *Chrysemis picta* è stato posto in un contesto di evoluzione comparata e si è focalizzata l'analisi sulle caratteristiche genomiche associate alla perdita dei denti, alle funzioni immunitarie, alla longevità, al differenziamento, alla determinazione del sesso e alle capacità fisiologiche di questa specie, di affrontare condizioni estreme di anossia e di congelamento dei tessuti. L'analisi filogenetica ha confermato che questa tartaruga appartiene a una specie sorella degli arcosauri (uccelli e coccodrilli viventi e dinosauri estinti) e ha evidenziato un tasso straordinariamente lento dell'evoluzione delle sue sequenze geniche (Shaffer, 2013).

La capacità di affrontare, sopravvivendo, un'anossia totale e il congelamento è associata a network di geni comuni nei vertebrati e ha permesso di identificare geni candidati per future analisi funzionali. La perdita dei denti condivide, con gli uccelli, un comune pattern di *pseudogenization* (selezione negativa: un allele, in precedenza funzionale, diventato inutile o dannoso, viene rimosso dalla selezione naturale) e di degradazione dei geni specifici per i denti (Shaffer, 2013).

I geni associati al differenziamento sessuale riflettono, generalmente, la filogenesi piuttosto che la convergenza nella funzionalità della determinazione sessuale. Tra le famiglie di geni che dimostrano un'eccezionale espansione o mostrano firme molecolari di una forte selezione naturale, quelle che presiedono alle funzioni immunitaria e muscolo-scheletrica sono consistentemente sovra-rappresentate (Shaffer, 2013). Le firme molecolari sono piccole molecole endogene di RNA (microRNA) di 20-22 nucleotidi, non codificante, a singolo filamento, con varie funzioni, tra le quali la regolazione trascrizionale e post-traslazionale dell'espressione genica. L'analisi genomica indica che network regolatori comuni ai vertebrati, alcuni dei quali trovano analoghi nelle patologie umane, sono spesso coinvolti nelle straordinarie capacità fisiologiche di *Chrysemis picta*. Quando queste *pathway* regolatorie saranno analizzate a livello funzionale, è prevedibile che questa tartaruga potrà offrire ulteriori, importanti informazioni e spunti nello studio e nella cura di numerose patologie umane (Shaffer, 2013).

Modello degli shift della fenologia riproduttiva indotti dal clima in funzione della temperatura

La fenologia è il ramo dell'ecologia che studia, classifica e registra i rapporti tra i fattori meteoclimatici ambientali (temperatura, umidità, fotoperiodo, vento) e i fenomeni biologici periodici rilevanti del ciclo vitale di piante (germogliamento, fioritura, nascita e caduta delle foglie, maturazione dei frutti) e di animali (migrazioni, accoppiamento, deposizione e schiusa delle uova di anfibi, rettili e uccelli, cicli di sviluppo degli insetti). Alterando la fenologia, animali e vegetali hanno la possibilità, entro certi limiti, si proteggersi dalle conseguenze dei cambiamenti climatici sfavorevoli, armonizzando gli eventi periodici del loro ciclo vitale con condizioni ambientali (più) favorevoli. La plasticità fenologica - o capacità di alterare la fenologia - è stata proposta, quindi, come meccanismo grazie al quale certe popolazioni possono tamponare le conseguenze negative dei cambiamenti climatici.

La capacità riproduttiva di *Chrysemis picta* è seriamente minacciata dai cambiamenti climatici globali, in particolare dall'aumento della temperatura ambientale. A questo riguardo, sono particolarmente interessanti gli studi sui peciloterми, tra cui *Chrysemis picta* e i rettili in generale, animali particolarmente sensibili alla temperatura ambientale, in quanto privi di meccanismi biogeni di regolazione autonoma della temperatura corporea (eterotermi), e come

i fenomeni biologici che li riguardano sono influenzati dalle variazioni climatiche stagionali e inter-annuali e da altri fattori ambientali. Lo studio della capacità potenziale di *Chrysemis picta* di affrontare tali effetti anticipando un parametro della fenologia riproduttiva, cioè la data di nidificazione, è stato condotto in un modello sperimentale che integra cambiamenti climatici, data di deposizione delle uova, effetti degli andamenti termici stagionali sul differenziamento sessuale e, quindi, sul rapporto numerico tra i sessi delle tartarughe neonate (Telemeco, 2013). I risultati di questo studio dimostrano che le femmine di *Chrysemis picta* non saranno, purtroppo, in grado di proteggere la loro progenie dalle conseguenze negative dei cambiamenti climatici col solo adeguamento della data di nidificazione alla temperatura ambientale. È perciò prevedibile che, in un non auspicabile futuro, le nidiate di *Chrysemis picta* saranno di sole femmine. Non solo, questi risultati fanno realisticamente prevedere che molte nidiate non arriveranno neppure alla schiusa delle uova. Poiché la maggior parte delle specie che vivono nelle zone temperate sono esposte agli stessi andamenti termici stagionali esaminati da questo studio su *Chrysemis picta*, il risultato che il solo adeguamento della fenologia primaverile non sarà sufficiente, in questa specie, a contrastare gli effetti dei cambiamenti climatici, può trovare una ben più ampia applicazione (Telemeco, 2013).

Bibliografia

- Ernst, C.H. & Lovich, J.E.,Turtles of the United States and Canada, 2nd Edition: pp.185-259 (The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 2009)
- Jackson, D.C., 2002; Hibernating without oxygen: physiological adaptations of the painted turtle. J. Physiol. vol. 543: pp. 731-737
- Packard, G.C. & Janzen, F.J., 1996; Interpopulational variation in the cold-tolerance of hatchling painted turtles. J. Thermal Biology. vol. 21: pp. 183-190
- Packard, G.C., Packard, M. J. , Morjan, C. L., and Janzen. F. J., 2002; Cold-tolerance of hatchling painted turtles (*Chrysemys picta bellii*) from the southern limit of distribution. *Journal of Herpetology* 36: 300-304.
- Schwarzkopf, L. & Brooks, R.J., 1985; Sex determination in northern painted turtles: effect on incubation at constant and fluctuating temperatures. Con. J. Zool. vol. 63: pp. 2543-2547
- Shaffer, H.B., et al., 2002; The western painted turtle genome, a model for the evolution of extreme physiological adaptations in a slowly evolving lineage. Genome Biol. vol 4, R28
- Taking the temperature of the painted turtle, 2013**;** Lab. Animal Europe, vol. 13, n. 10: p. 27
- Telemeco, R.S., Abbott, K. C., and Janzen, F. J., 2013; Modeling the Effects of Climate Change–Induced Shifts in Reproductive Phenology on Temperature-Dependent Traits. Am. Nat. Vol. 181: 637-648.
- Valenzuela, N., in Emerging Model Organisms: A Laboratory Manual, vol. 2 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N.Y., 2009)

MICROTUS OCHROGASTER, RODITORE, MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DELLE BASI NEUROLOGICHE, GENETICHE, EVOLUTIVE E MOLECOLARI DEI COMPORTAMENTI SOCIALI

Domenico Barone

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Introduzione

Le arvicole della prateria sono piccoli mammiferi, diffusi nel Nord America, in Europa e in Asia settentrionali, che da alcuni anni rappresentano il modello sperimentale di elezione per lo studio delle basi neurologiche, genetiche, evolutive e molecolari dei legami e dei comportamenti sociali, quali il legame di coppia, la scelta e la predilezione per il partner, la cura biparentale della prole e altri aspetti sul modo in cui le informazioni su altri individui della stessa specie sono elaborate, archiviate e utilizzate (*social cognition*).

La formazione di rapporti durevoli tra partner adulti è una componente importante del comportamento sociale umano e, spesso, anche di quello animale, che è stata oggetto di molte ricerche sulla salute sia fisica che psicologica. Tuttavia, a causa della complessità di questi legami, della relativa rarità con la quale si ritrovano in altre specie di mammifero e delle oggettive difficoltà inerenti questa tipologia di ricerca, si conosce incredibilmente poco sulla componente neurobiologica che sta alla loro base.

Gli studi fondati sul modello sperimentale *Microtus ochrogaster* hanno fornito, in particolare, molte informazioni sui meccanismi che regolano i rapporti che formano e tengono unita la coppia.

Le arvicole della prateria

Questi piccoli roditori, delle dimensioni di un criceto, hanno cranio tozzo, piccoli occhi e piccole orecchie, coda corta e pelosa, pelo folto e lungo, ruvido e ispido, di colore grigio-marrone sul dorso. Il loro nome tassonomico, *Microtus ochrogaster* (famiglia *Cricetidae*, ordine *Rodentia*), deriva dal greco e si richiama ad alcuni dei tratti somatici salienti di questi piccoli mammiferi: il nome del genere di appartenenza (*Microtus*) si riferisce alle loro orecchie piccole, mentre il nome della specie (*ochrogaster*) indica il colore grigio con striature

Fig. 1. *Microtus ochrogaster*

Fig. 2. *Microtus ochrogaster*

giallastre del pelo ventrale. Gli individui di questa specie non mostrano dimorfismo sessuale per quanto riguarda dimensioni corporee e colore del pelo; gli adulti misurano 12,5-18,0 cm di lunghezza e pesano 30-70 grammi (fig. 1 e 2). Vivono in colonie di circa 300 individui; in cattività possono vivere 1-3 anni, si riproducono 3-6 volte nell'anno, partorendo 2-7 piccoli/parto (Prairie voles pair up, 2013). A differenza delle arvicole di altre specie, quelle della prateria sono strettamente monogame e formano coppie unite da legami molto forti e stabili, che durano per tutta la vita della coppia e anche oltre, tant'è che, quando un membro della coppia muore, il partner che gli sopravvive rimane solo, anziché formare una nuova coppia. Maschio e femmina rimangono insieme dopo il parto, condividono il nido, strigliano vicendevolmente il pelo e si dedicano alla cura della prole (Prairie voles pair up, 2013).

Alcuni ricercatori, studiando le basi neurobiologiche di questi comportamenti sociali, hanno confrontato l'espressione di neurormoni peptidici ipofisari e di neurotrasmettitori delle arvicole della prateria con quella delle arvicole della montagna (*Microtus montanus*), che sono poligame e parenti congenici di quelle della prateria, e hanno riscontrato marcate differenze tra le due specie nella distribuzione e densità dei recettori cerebrali della arginina-vasopressina, dell'ossitocina e della dopamina (Young, 2011). Questi recettori sono concentrati in strutture neurali, quali il *nucleus accumbens*, note come "sistema di gratificazione", dove mediano l'effetto del rafforzamento di un comportamento a seguito di una gratificazione (Young, 2001).

La densità dei recettori della vasopressina nell'area pallida ventrale, che è il maggior output del *nucleus accumbens*, è molto maggiore nel *Microtus ochrogaster* che nel *Microtus montanus*. Nella specie monogama *ochrogaster*, i neuropeptidi vasopressina e ossitocina, interagendo con i rispettivi recettori, coordinano comportamenti premianti, quali l'accoppiamento, regolano la scelta selettiva del partner e contribuiscono all'elaborazione dei comportamenti sociali necessari al riconoscimento individuale (Young, 2001). La formazione di un forte legame monogamico dipende dalle modifiche stabili dei profili di espressione dei geni dell'ossitocina e della vasopressina, innescate dall'accoppiamento ma, come vedremo, inducibili anche per via farmacologica, purché la somministrazione del farmaco avvenga in concomitanza con un rapporto sociale, anche di breve durata, tra i futuri partner. Il blocco dei recettori dell'ossitocina, per mezzo di iniezioni sito-specifiche di antagonisti oppiacei nel cervello delle femmine di arvicole della prateria, inibisce il processo che porta alla scelta del partner.

La dopamina della via mesolimbica - *pathway* che collega l'area tegmentale ventrale al *nucleus accumbens* (nella porzione ventrale del nucleo striato) attraverso l'amigdala e l'ippocampo, entrambi al centro del sistema di ricompensa del cervello - si pensa che giochi un ruolo importante nei processi di gratificazione e piacere associati a stimoli appetitivi e nei processi di rinforzo nell'elaborazione delle sensazioni di piacere e paura. La stimolazione simultanea dei recettori di questi due neuropeptidi e di quelli della dopamina, nei centri cerebrali della gratificazione durante l'accoppiamento, genera una preferenza condizionata per il partner, creando il legame di coppia forte e duraturo di cui si è detto (Young, 2001). Tra le principali gratificazioni ci sono quelle finalizzate alla sopravvivenza della specie, quali il cibo, il rapporto sessuale o un comportamento aggressivo vittorioso.

Più di recente, altre differenze recettoriali sono state individuate tra le arvicole della prateria, monogame, e quelle poligame della montagna, riguardanti la diversa espressione dei recettori μ-oppiacei, che potrebbe contribuire alle differenze comportamentali rilevate tra queste due specie di roditori (Inhoie, 2013; Resendez, 2013). Le arvicole della prateria hanno densità significativamente più elevate di recettori μ-oppiacei nella maggioranza delle diverse regioni del forebrain (prosencefalo), inclusi i nuclei talamici antero-ventrale e antero-laterale. I recettori μ-oppiacei situati nel nucleo striato (parte dorsale, *core* e *shell* del *nucleus accumbens*) sono coinvolti, in modo anatomicamente segregato, nei processi motivazionali

e mediano molteplici forme di rapporti sociali, incluso il legame della prole per la madre e il vincolo sociale che tiene uniti i due individui di una coppia (Inhoie, 2013; Resendez, 2013). I recettori situati invece nello *shell* dorso-mediale del *nucleus accumbens* mediano motivazioni edoniche positive, coinvolte nell'induzione di sensazioni di piacere.

La possibilità di correlare geni e comportamenti in questa specie animale è stata limitata a lungo dalla mancanza di informazioni genetiche e genomiche.

Genetica e genomica di Microtus ochrogaster

Per superare il limite posto alla ricerca dall'assenza di informazioni genetiche e genomiche relative a *Microtus ochrogaster*, è stata creata una piattaforma per lo sviluppo delle risorse genomiche di questo modello sperimentale.

A tal fine, è stata costruita e caratterizzata una *library* cromosomica batterica artificiale (BAC *library*) ottenuta da un singolo maschio di arvicola della prateria, e una mappa citogenetica comparativa sviluppata da un topo della prateria (*Mus musculus*) (McGraw, 2010a). Questa BAC *library*, con la mappa citogenetica comparativa arvicola-topo, rappresenta la prima risorsa genomica sviluppata per questa specie a livello dell'intero genoma. La BAC *library* rende fattibile la caratterizzazione genomica, genetica e molecolare di *Microtus ochrogaster* e la caratterizzazione delle sequenze regolatorie e codificanti dei geni coinvolti nei comportamenti sociali (McGraw, 2010a). È stata anche costruita, per l'intero genoma di *Microtus ochrogaster*, una mappa genetica ad alta risoluzione di associazione delle frequenze di ricombinazione tra 406 marker durante il crossover di cromosomi omologhi (*genetic linkage map*), che fornisce le posizioni relative dei geni sui cromosomi (McGraw, 2011). Alcuni di questi geni sono stati sequenziati di recente, inclusi quelli che codificano per arginina-vasopressina, ossitocina, dopamina e per i rispettivi recettori. La *genetic linkage map* permetterà di progredire nell'analisi delle basi genetiche di una varietà di comportamenti sociali e di altre caratteristiche di *Microtus ochrogaster* e faciliterà la comprensione dell'evoluzione del genoma nel genere *Microtus* (McGraw, 2011), finora limitata dalla mancanza di informazioni genetiche e genomiche su questa specie. La BAC *library* ha permesso il sequenziamento di 21 geni rilevanti dal punto di vista del comportamento e di 55 *flanking genes*, risorse necessarie per la caratterizzazione molecolare e genetica di un gruppo di geni candidati considerati a elevata priorità per la regolazione/il controllo dei comportamenti sociali di *Microtus ochrogaster* (McGraw, 2012). Si è visto che l'accoppiamento induce l'instaurarsi di durevoli legami di coppia, che iniziano con la formazione della preferenza per il partner e sono regolati da vari neutrotrasmettitori. Poiché il legame di coppia si instaura solo dopo l'accoppiamento, si è ipotizzato che meccanismi epigenetici[1] siano coinvolti nella sua regolazione. Questi meccanismi, grazie a sostanze chimiche che, interagendo con i cromosomi, inibiscono o stimolano l'espressione genica, influenzano il fenotipo (in questo caso, l'espressione dei neurotrasmettitori e il conseguente comportamento sociale di *Microtus*), senza alterare il genotipo (cioè la sequenza nucleotidica dei geni coinvolti).

Per verificare questa ipotesi, femmine di arvicole della prateria adulte, ma sessualmente *naïve*, sono state poste per 6 ore in gabbia con un maschio (una coppia/gabbia), senza che potesse avvenire l'accoppiamento, a causa del tempo troppo breve trascorso insieme dai due partner. Tricostatina A[2] e sodio butirrato[3], inibitori dell'istone deacetilasi[4], hanno facilitato in queste femmine la formazione della preferenza per il partner in assenza di accoppiamento (Wang, 2013). A ciò si è associata una *upregulation* specifica dei recettori dell'ossitocina (*oxtr*) e di quelli della vasopressina (*avpr1*) nel *nucleus accumbens*, grazie a un aumento dell'acetilazione degli istoni[5] a livello dei rispettivi promotori genici. È importante aggiungere che la preferenza per il partner, in femmine non trattate con tricostatina A, ha innescato la stessa

regolazione epigenetica dei promotori dei geni *oxtr* e *avpr1* indotta da tricostatina A. Non solo, l'inibizione di modifiche epigenetiche nel cervello delle arvicole femmine ha portato a una trascrizione dei recettori di ossitocina e vasopressina maggiore di quella indotta dall'accoppiamento, confermando il rapporto tra modifiche epigenetiche e legame di coppia. Inoltre, la preferenza per il partner, facilitata da tricostatina A, è stata prevenuta dal blocco dei recettori di vasopressina e ossitocina nel *nucleus accumbens*.

Questi risultati indicano che accoppiamento e triscostatina A facilitano l'insorgenza della preferenza per il partner attraverso eventi epigenetici, e questa è la prima dimostrazione diretta della regolazione epigenetica del legame di coppia.

Riassumendo, questi risultati dimostrano che:

la preferenza per il partner, indotta dall'accoppiamento, innesca le stesse regolazioni epigenetiche dei promotori dei geni *oxtr* e *avpr1*, innescate da tricostatina A;

altri fattori legati al contatto sociale contribuiscono alla formazione del legame di coppia.

Il tempo trascorso insieme dai due partner della coppia, senza che si verificasse l'accoppiamento, ha indotto una sorta di "imprinting mentale" che, combinato con l'aumento dei valori di vasopressina e ossitocina, fa sì che le arvicole della prateria siano disposte ad accoppiarsi con quell'unico partner per il resto della vita (Wang, 2013).

Le arvicole della prateria sono state proposte come modello potenziale per lo studio dei disturbi della *social cognition* (codifica, conservazione, recupero ed elaborazione di informazioni nel cervello relative a individui della propria specie), inclusi deficit cognitivi sociali che sono caratteristici di molte patologie psichiatriche, quali le varie forme di autismo e di schizofrenia.

Benché le ricerche sul comportamento sociale delle arvicole della prateria non possano, realisticamente, far sperare di identificare i meccanismi alle base di queste patologie umane, i risultati di questi studi potrebbero, comunque, aiutare a individuare le *pathway* genetiche e i sistemi neurobiologici coinvolti nella regolazione degli aspetti del comportamento sociale, e a indirizzare strategie terapeutiche nuove e originali per la cura di tali deficit (McGraw, 2010b).

Grazie all'evoluzione degli strumenti molecolari, genetici e genomici in atto su *Microtus ochrogaster*, è prevedibile che questo piccolo roditore diventerà sempre più un modello di studio insostituibile nelle ricerche di base e traslazionali focalizzate sulla biologia del "cervello sociale", cioè di quell'insieme di strutture e di meccanismi neurali che presiedono sia alle nostre interazioni sia ai nostri pensieri e sentimennti verso i nostri simili (McGraw, 2010a).

Bibliografia

- Inoue, K. E., Burkett J. P., Young L. J., 2013 ; Neuroanatomical distribution of μ-opioid receptor mRNA and binding in monogamous prairie voles (Microtus ochrogaster) and non-monogamous meadow voles (Microtus pennsylvanicus). Neuroscience, vol. 244: pp. 122-133
- McGraw, L. A., Davis, J. K., Lowman, J. J., ten Hallers, B. F. H., Koriabine, M., Young, L. J., de Jong, P. J., Rudd, M. K., Thomas, J. W., 2010a; Development of genomic resources for the prairie vole (Microtus ochrogaster): construction of a BAC library and vole-mouse comparative cytogenetic map**.** BMC Genomics. 2010a; vol. 11: p. 70
- McGraw, L.A. & Young, L.J., 2010b; The prairie vole: an emerging model organism for understanding the social brain. Trends Neurosci. vol. 33: pp. 103-109
- McGraw, L.A., Davis, J. K., Young, L. J., Thomas, J. W., 2011; A generic linkage map and comparative mapping of the prairie vole (*Microtus ochrogaster*) genome. BMC Genet.; vol. 12: pp. 60
- McGraw, L.A., Davis, J. K., Thomas, P. J., NISC Comparative Sequencing Program, Young, L. J., Thomas, J. W. , 2012; BAC-based sequencing of behaviorally relevant genes in the prairie vole. PLoS One vol. 7(1): e29345
- Prairie voles pair up, 2013; Lab. Animal Europe vol. 13, n. 8,: p. 28
- Resendez, S, L., Dome, M, Gormley, G., Franco, D., Nevarez, N., Hamid, A. A., 2013; mu-Opioid receptors within subregions of the striatum mediate pair bond formation through parallel yet distinct reward mechanisms. J. Neurosci. 33: 9140–9149
- Wang, H., Duclot, F., Liu, Y., Wang, Z., Kabbaj, M., 2013; Histone deacetylase inhibitors facilitate partner preference formation in female prairie voles. Nat. Neurosci. 2013, vol. 16: pp. 919-924.
- Young, L.J., Lim, M. M., Gingrich, B., Insel, T. R., 2001: Cellular mechanisms of social attachment. Horm. Behav., vol. 40: pp. 133–138.
- Young, K. A., Gobrogge, K. L., Liu, Y., Wang, Z., 2011; The neurobiology of pair bonding: Insights from a socially monogamous rodent. Front Neuroendocrinol, 32: pp. 53–69

ACOMYS CAHIRINUS (*SPINY MOUSE*), RODITORE, MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DELLE MESTRUAZIONI NELLA DONNA

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Mestruazioni e infiammazione

Il termine "mestruazione" deriva dal latino di tradizione medica *menstruatio* ("mensilità"), sostantivo a sua volta derivato dall'aggettivo *menstrûus* ("una volta al mese", mensile). L'uso grammatico al plurale, mestruazioni, indica un evento ciclicamente ricorrente. Alle mestruazioni segue la rigenerazione dello strato superficiale dell'endometrio, la mucosa che ricopre la cavità interna dell'utero.

Le mestruazioni si manifestano con perdita di sangue proveniente dalla cavità uterina, in seguito allo sfaldamento dello strato superficiale dell'endometrio. Si verifica ciclicamente, durante ogni normale ciclo riproduttivo non fertile, nelle donne in età fertile e in alcuni primati del Vecchio Mondo, e rappresenta lo stadio finale del ciclo mestruale. Le mestruazioni si verificano a seguito dell'innesco (*priming*), causato dal progesterone (PR), dello stroma endometriale e da una reazione deciduale spontanea. Se non avviene la fecondazione, alla fine di ogni ciclo non fertile, col calo dei livelli circolanti di estrogeni e PR, l'utero non è più in grado di mantenere questo stroma differenziato in modo terminale: l'endometrio superficiale si sfalda, staccandosi, e si ha la mestruazione, che nella donna dura mediamente 3-6 giorni.

Le mestruazioni presentano molti degli aspetti tipici di un processo infiammatorio, che portano allo sfaldamento finale dello strato superficiale dell'endometrio e al sanguinamento. Il PR ha proprietà anti-infiammatorie e il rapido calo dei suoi livelli circolanti e di quelli degli estrogeni, al termine della fase secretoria di ogni ciclo mestruale, scatena una sequenza di eventi inter-dipendenti di natura infiammatoria, che coinvolgono interazioni inter-cellulari locali nell'endometrio. Le risposte intracellulari al drammatico calo del PR, nelle cellule stromali decidualizzate e nelle cellule vascolari ed epiteliali, portano al ridotto metabolismo delle prostaglandine e alla perdita della protezione dalle *reactive oxygen species* (ROS), il cui aumento induce il rilascio di NF-kB, con attivazione della trascrizione dei geni *target* e aumentata sintesi di prostaglandine pro-infiammatorie, citochine, chemochine e metalloproteinasi (MMP) della matrice cellulare.

Il reclutamento dei leucociti che ne deriva, con cambiamento dei fenotipi e dell'attivazione, fornisce ulteriori enzimi litici e attivatori delle MMP che, insieme all'ambiente ipossico mediato dall'azione delle prostaglandine, porta allo sfaldamento dello strato superficiale dell'endometrio e al sanguinamento. Parallelamente, nei siti dove il distacco del tessuto è totale, cambiamenti indotti dal microambiente nel fenotipo di neutrofili e macrofagi da pro- ad anti-infiammatori, oltre all'induzione di fattori di crescita, contribuiscono a una rapida proliferazione cellulare, con riepitelizzazione e ricostituzione del tessuto integro funzionale (Evans, 2013).

Inizia poi un nuovo ciclo riproduttivo: i livelli circolanti degli estrogeni aumentano e stimolano la proliferazione cellulare e il ristabilimento delle componenti stromali e vascolari dell'endometrio. L'origine delle cellule che ripopolano la superficie interna dell'utero, dopo ogni ciclo mestruale, non è ancora del tutto chiarita. A ogni ciclo riproduttivo (durata di circa

28 giorni nella donna), l'endometrio va incontro a un profondo rimodellamento, che non ha pari in nessun altro organo dell'adulto.

Modelli animali per lo studio della fisiologia e delle patologie delle mestruazioni

Indicando con il termine mestruazioni l'eliminazione ciclica, attraverso la vagina, di sangue, secrezioni e frammenti di tessuto endometriale decidualizzato, derivanti dal processo involutivo dell'endometrio al termine di un ciclo riproduttivo non fertile, si ha una chiara evidenza che questo fenomeno è limitato all'1,51% delle 5502 specie di mammiferi conosciute: 78 specie di primati di ordine superiore (uomo e scimmie del Vecchio Mondo), 4 specie di pipistrelli e il toporagno (*Elephantulus rufescens*). Comune a queste specie, e intrinseca al processo mestruale, è la decidualizzazione spontanea dello stroma endometriale, in assenza dell'iniziazione da parte di un embrione che si impianta.

Un modello murino di mestruazioni indotte

Il topo (*Mus musculus*) non è un modello animale adatto allo studio delle mestruazioni umane, perché il suo ciclo estrale differisce da quello mestruale umano: se non avviene il concepimento, il topo riassorbe il rivestimento endometriale, mentre i mammiferi che mestruano lo eliminano, tramite le mestruazioni. Il ciclo estrale delle femmine di topo dura circa 5 giorni, mentre l'estro vero e proprio dura una ventina d'ore. Le 4 fasi del ciclo estrale (proestto, estro, metestro, diestro) sono evidenziabili in base alle cellule presenti nello striscio vaginale.

Nel tentativo di mettere a punto un modello animale che riproducesse le mestruazioni umane, vere mestruazioni sono state indotte artificialmente nel topo, a metà degli anni '80 del secolo scorso. Topi ovariectomizzati sono stati preparati per la decidualizzazione con somministrazione di estrogeni, PR e olio di arachidi iniettato nel lume uterino, per indurre i cambiamenti che si realizzano nei tessuti che permettono l'impianto dell'embrione (decidualizzazione). I cambiamenti nell'endometrio indotti nel topo con interventi chirurgico e ormonale ricordano quelli delle mestruazioni umane. Affinché queste avvengano, lo stroma dev'essere differenziato per l'impianto, come avviene nelle donne durante il ciclo, ma non si verifica spontaneamente nei mammiferi non-primati, a meno che sia applicato uno stimolo deciduale intrauterino (Finn, 1984).

Questo modello murino di induzione delle mestruazioni è stato rivisitato criticamente, modificato da Brasted *et al*. (2003), e messo a punto nel ceppo di topi *inbred* C57BL/6 (8-12 settimane di età) (fig. 1). Il principale obiettivo della revisione di questo metodo era la messa a punto di un modello animale che riproducesse l'esatta sequenza temporale degli eventi dello sfaldamento dello strato superficiale dell'endometrio e della sua ricostituzione, e che permettesse di valutare il numero dei leucociti e l'entità dell'apoptosi nella fase di sfaldamento.

Fig. 1. *Mus musculus, ceppo C57BL/6* (da: jax.org)

Fig. 2. *Acomys cahirinus* (*Cairo spiny mouse*) (da: stjamas.com)

Topi sono stati ovariectomizzati 7 giorni prima della 1ª di 3 iniezioni (1/giorno) sottocutanee di 100 ng di 17β-estradiolo in olio di arachide. Dopo un intervallo di 3 giorni sono stati inseriti nel dorso impianti sottocutanei di PR in tubicini di silicone (lunghzza 1 cm; diametro interno 1,57 mm), seguiti da 5 ng di 17β-estradiolo in olio di arachidi per iniezione sottocutanea, ripetuta nei 2 giorni seguenti, 1/giorno). Nel terzo giorno di somministrazione di 17β-estradiolo sono stati iniettati, nel lume del corno uterino destro, 20 µl di olio di sesamo per indurre la decidualizzazione; il corno uterino sinistro, non trattato, è servito da controllo. Gli impianti di PR sono stati rimossi 49 ore più tardi (Brasted, 2003).

Questo studio ha affinato e valutato a fondo il modello murino di mestruazioni indotte descritto da Finn e Pope (1984), nel quale la somministrazione di PR in topi ovariectomizzati, e con endometrio decidualizzato artificialmente, viene sospesa bruscamente. Questa situazione mima il quadro morfologico, citologico e istologico degli eventi che rimodellano una forma di mestruazione nella quale sia il distacco del tessuto endometriale degradato sia la riepitelizzazione procedono molto rapidamente. Tuttavia, ci sono differenze sostanziali tra le mestruazioni umane e quelle riprodotte artificialmente in questo modello murino. Quella forse più rilevante è l'entità della decidualizzazione. Durante il ciclo normale umano, la decidualizzazione inizia nei pressi delle arteriole spirali, verso la metà/la fine della fase secretoria, per poi diffondersi attraverso i 2/3 dell'endometrio. Quest'espansione cellulare pre-deciduale non è dovuta solo a ipertrofia cellulare, ma anche alle mitosi, come accade per la decidualizzione nel topo. La decidualizzazione, o almeno l'inizio di uno stato predeciduale nello stroma endometriale, è un prerequisito affinché avvenga la mestruazione.

I risultati ottenuti da Finn e Brasted dimostrano che è possibile trasformare in topi di laboratorio un ciclo estrale in uno mestruale, simile alle mestruazioni della donna. Non si tratta però di un modello di mestruazioni spontanee, perchè prevede ovariectomia chirurgica, impianto sottocutaneo di *device* per la somministrazione di dosi anormalmente elevate di PR, iniezioni di sovradosaggi di estradiolo e induzione della decidualizzazione con olio di sesamo intrauterino.

Tuttavia questo modello murino riproduce molti degli eventi delle mestruazioni spontanee umane e dei primati superiori e ne rispetta la sequenza, dimostrando di essere un metodo potenzialmente utile per chiarire i ruoli funzionali di una varietà di fattori ritenuti rilevanti, sia nelle mestruazioni sia nella ricostruzione dell'endometrio. Il modello di Finn/Brasted rende possibili studi funzionali per determinare quali siano i fattori critici in questi processi e una valutazione più stringente dell'evoluzione e sequenza di tali eventi. Ricerche in questo campo sono essenziali, se si vuole progredire nel trattamento razionale delle patologie mestruali e della riparazione dell'endometrio.

Foto 3. *Meriones unguiculatus* (gerbillo della Mongolia) (da: glickriver.com)

Molti eventi molecolari e cellulari delle mestruazioni sono stati identificati e descritti da ricerche *in vitro* e *in vivo*, ma la mancanza di un modello spontaneo, in un animale da laboratorio, che riproduca in modo naturale tutta la cascata degli eventi che si verificano durante le mestruazioni umane, ha limitato gli studi funzionali e le patologie associate alle mestruazioni, quali l'endometriosi e la sindrome pre-mestruale. Una vera mestruazione, come quella umana, non è mai stata descritta nei roditori che, per vari motivi, sono animali di elezione per ricerche di laboratorio. Così, molti aspetti di questo fenomeno sono stati chiariti solo in parte, frenando la ricerca e sviluppo di trattamenti efficaci per la donna. Più in generale, la comprensione degli stati della salute femminile, che interessano la sfera dei cicli riproduttivi, è rimasta poco conosciuta.

Un modello murino di mestruazione spontanea

Recentemente (marzo 2016) ricercatori australiani hanno descritto un modello animale di mestruazione spontanea nello *spiny mouse* (*Acomys cahirinus*) (fig. 3), prima, e per ora unica, specie roditrice nella quale è stata descritta una capacità di mestruare molto simile alle mestruazioni della donna e dei primati non umani.

Spiny mouse fornisce un modello naturale senza precedenti in un non-primate, che permetterà di studiare i meccanismi dello sfaldamento mestruale e della riparazione dell'endometrio e sembra promettente anche per il progresso della comprensione delle patologie umane specifiche delle mestruazione e della gravidanza.

Acomys cahirinus

L'aggettivo *spiny* indica qualunque specie di roditore del genere *Acomys* (Ordine *Rodentia*, Famiglia *Muridae*). Gli individui della specie *Acomys cahirinus* (*Cairo spiny mouse*, topo spinoso de il Cairo, E. Geoffroy, 1803) (fig. 2) sono simili nell'aspetto ai topi del genere *Mus*, ma evidenze genetiche indicano che sono più vicini ai gerbilli (*Meriones unguiculatus*) (foto 3) che ai topi comuni.

Vivono nell'Africa nord-orientale, dalla Libia fino al Sinai a est e Gibuti a sud; sono di piccole dimensioni (75-138 mm) e pesano fino a 64 g; hanno pelliccia particolarmente spinosa sul dorso, dal colore bruno-rossastro al marrone scuro; i peli, spinosi, hanno la base bianca o grigio chiara, mentre le parti ventrali e le zampe sono grigie o biancastre. Il muso è appuntito, gli occhi sono grandi e scuri, con una macchia biancastra sotto ognuno di essi. Le vibrisse sono lunghe, le orecchie grandi, scure e rivestite di corti peli biancastri, ognuna

con una macchia bianca alla base anteriore e posteriore. La pianta dei piedi è chiara, la coda è lunga quanto la testa e il corpo, scura sopra, più chiara sotto, con anelli di scaglie larghi ed è ricoperta di piccole setole biancastre o brunastre. È una specie terricola e diurna, attiva soprattutto la mattina e la sera. Gli *spiny mice* si riparano nelle feritoie delle rocce o scavano semplici tane in terreni morbidi. Se disturbatati, rizzano i peli spinosi del dorso. Si nutrono di foglie, semi, frutta, lumache, insetti e scorpioni. Danno alla luce 1-5 piccoli/parto, dopo una gestazione di 38 giorni in cattività, di 42 in natura. Raggiungono la maturità dopo 2-3 mesi di vita. Le femmine hanno un paio di mammelle pettorali e due paia inguinali. Il cariotipo è 2n=36-38 FN=68-72.

***Acomys cahirinus*, modello animale di mestruazioni umane**

A differenza del modello di Finn, rivisto da Brasted nei topi C57BL/6, il protocollo di questo nuovo modello animale in *Acomys cahirinus* per lo studio delle mestruazioni e delle patologie connesse non necessita di strategie per renderlo simile alle mestruazioni umane, quali interventi chirurgici (ovariectomia), dosi elevate di trattamenti ormonali, e non necessita della somministrazione intrauterina di olio di arachide, o di sesamo, per indurre la decidualizzazione dell'endometrio (Bellofiore, 2016).

Il disegno sperimentale prevede l'uso di femmine vergini di *spiny mice* (12-16 settimane di età), campionate attraverso lavaggio vaginale quotidiano, consoluzione fisiologica sterile, per 2 cicli riproduttivi completi e consecutivi. E' stata fatta una raccolta fase-specifica di tessuto riproduttivo e di plasma per indagini istologiche, immunoistochimiche dei livelli di prolattina e di PR con ELISA, per ogni ciclo mestruale. Lo *smear test* è stato ripetuto per 18 giorni consecutivi. La durata media del ciclo è stata di 8,7±0,4 giorni (*range*: 6-10 giorni) e il sanguinamento è durato 3 giorni, 20-40% del ciclo, rapporto simile a quello della donna (15-35%) e in tutte le femmine (vergini) è stato verificato lo sfaldamento ciclico dell'endometrio.

L'esame citologico dei lavaggi vaginali quotidiani ha mostrato tutti i 4 stadi del ciclo estrale dei roditori: fase follicolare (proestro+estro) e fase luteale (metestro+diestro), più una 5ˆ fase, della durata di 3,0±0,2 giorni, assente negli altri roditori, caratterizzata dalla presenza di numerosi globuli rossi, coerente con le mestruazioni. Sangue era presente nei lavaggi vaginali di tutte le femmine, durante la transizione dalla fase luteale a quella follicolare, alla conclusione di ogni ciclo non fertile, in ambedue i cicli studiati.

Dissezioni del tratto riproduttivo hanno mostrato differenze significative nel peso dell'utero durante il ciclo riproduttivo, con sangue presente nel lume uterino, corrispondente al tempo di rilevamento con lo *smear test*. Tempistica e ricorrenza del sanguinamento dimostrano una robusta evidenza di mestruazioni nello *spiny mouse*. Per assicurarsi che il sanguinamento non fosse causato da traumi durante il lavaggio vaginale, topi C57BL/6 sono stati sottoposti alla stessa procedura di lavaggio, senza che comparissero tracce di sangue in nessuna delle fasi estrali.

Cambiamenti istologici nel tratto riproduttivo sono stati evidenziati con la colorazione tricromica di Mallory (fucsina acida che colora in rosso i nuclei, blu di metilene o azzurro di anilina, dopo mordenzatura con acido fosfomolibdico, che colorano il collagene in azzzurro, e *orange* G, che colora i citoplasmi in arancione). Durante la fase follicolare, lo spessore dell'endometrio era ~65 μm; le ovaie contenevano follicoli antrali prima della rottura e sviluppo in corpi lutei. Nella fase luteale si potevano osservare rimodellamento vascolare e decidualizzazione, spessore dell'endometrio accresciuto di 4-5 volte (~320 μm) e ridotto diametro del lume uterino, quando i livelli plasmatici di PR raggiungevano valori di picco (102,1 ng/mL). Seguiva la degenerazione del corpo luteo, coincidente con il distacco dell'endometrio.

La colorazione immunoistochimica della prolattina confermava la decidualizzazione dell'endometrio, ma era assente durante l'ovulazione. Abbondanti cellule deciduali immuno-

positive erano presenti nell'endometrio durante la fase luteale. L'immunocolorazione della prolattina è stata quantificata tramite densità ottica: nella fase luteale, la colorazione è stata la più intensa seguita, circa 2 giorni più tardi, dal distacco del rivestimento uterino.

Il PR plasmatico è stato determinato con metodo ELISA, per chiarire se i dati istologici e immunoistochimici correlavano con i cambiamenti ormonali compatibili col processo di mestruazione. Aumenti significativi dei livelli plasmatici, con valore di picco 102,1 ng/mL, erano rilevabili nella fase lutea rispetto a tutte le altre fasi. I cambiamenti citologici ed emorragici specifici delle mestruazioni sono incominciati quando le concentrazioni plasmatiche di PR hanno iniziato a scendere, e ciò rappresenta un *marker* di decidualizzazione spontanea (Bellofiore, 2016).

Lo *spiny mouse* è andato incontro a decidualizzazione spontanea, dimostrando per la prima volta la presenza di vere mestruazioni in una specie roditrice. Come nelle altre specie che mestruano, il ciclo riproduttivo di *Acomys cahirinus* presenta 2 fasi, una uterina e una ovarica. Ipotesi recenti suggeriscono che le mestruazioni siano una conseguenza della decidualizzazione spontanea, e che questa sia evoluta in quelle specie con tessuti fetali molto invasivi e con un elevato tasso di anormalie cromosomiche embrionali (Clarke, 1997; Emera, 2012).

Ancora non si sa, e non ci sono ipotesi al riguardo, come e perché le mestruazioni di *spiny mouse* siano evolute, ma questa specie condivide molti aspetti della sfera riproduttiva con altri mammiferi che mestruano, inducendo a ipotizzare un'evoluzione parallela di queste caratteristiche con le mestruazioni: ad esempio, decidualizzazione spontaanea, placentazione emocoriale, ovulazione spontanea e pochi, ma ben sviluppati, neonati/parto (Peitz, 1981; O'Connel, 2013). Così, *Acomys cahirinus*, diventa a pieno diritto la 79^ specie di mammiferi che mestruano.

La scoperta di mestruazioni in una specie roditrice è senza precedenti e fa pensare che questo fenomeno sia stato trascurato e sottovalutato da generazioni di ricercatori, condizionati dal dogma in voga che "i roditori sono mammiferi che non mestruano". Sarebbe interessante sapere se le mestruazioni sono presenti nelle altre 18 specie del genere *Acomys* e nei generi correlati *Uracomys*, *Deomys, Lophuromys*, nonché in *Meriones* (*Meriones unguiculatus*, gerbillo della Mongolia) (fig. 3) e in *Tatera indica* (gerbillo indiano). La posizione periferica che gli *Acomynae* occupano nella maggior parte delle filogenesi dei roditori, suggerisce che sarebbe utile e appropriato, alla luce di queste caratteristiche insolite degli *spiny mice*, estendere l'analisi filogenetica di questo e dei generi correlati (Bellofiore, 2016).

Conclusioni

Lo *spiny mouse* è la prima specie roditrice nella quale è stato identificato e caratterizzato un ciclo mestruale spontaneo molto simile a quello umano. Questo topo rappresenta quindi un modello animale naturale senza precedenti in un non-primate, che apre nuove possibilità alla ricerca biomedica nello studio dei meccanismi di sfaldamento dell'endometrio e della sua riparazione/ricostituzione, e può risultare utile nel promuovere la comprensione delle patologie umane associate alla sindrome pre-mestruale, all'endometriosi (che sviluppa spontaneamente) e alla gravidanza.

La maggior parte delle ricerche in questo ambito sono state fatte finora con i babbuini, comunemente usati come modello di endometriosi, ma la ricerca con l'uso di primati è costosa, richiede tempi lunghi, presenta difficoltà organizzative ed è irta di problemi riguardo i diritti degli animali.

Saranno necessarie molte ricerche ancora, di biochimica, di biologia molecolare, di proteomica, di genetica e di epigenetica, per validare *Acomys cahirinus* come modello animale per lo studio della fisiologia e delle disfunzioni mestruali. Recentemente, il genoma di questo roditore è stato sequenziato, e ciò faciliterà studi volti a chiarire quali siano i geni responsabili della regolazione del ciclo mestruale e i loro prodotti.

Bibliografia

- Bellofiore, N., Ellery, S. J., Mamrot, J., Walker, D. W., Temple-Smith, P., Dickinson, H., 2016; First evidence of a menstruating rodent: the spiny mouse (Acomys cahirinus). Am. J. Obstet. Gynaecol., doi: 10.1016/j.ajog.2016.07.041. Presented at the 1st Annual Meeting of the Society for Reproductive Investigation. 63rd Annual Scientific Meeting, Montreal, Quebec, Canada, March 16-19, 2016**;** Perinatal Society of Australia and New Zealand, Townsville, Queensland, Australia. May 22-25, 2016
- See comment in PubMed Commons belowBrasted, M., White, C. A., Kennedy, T. G., Salamonsen, L. A., 2003; Mimicking the events of menstruation in the murine uterus. Biol Reprod., vol. 69 (4):1273-2780
- Clarke, J., 1997; The adaptive significance of menstruation: The meaning of menstruation in the elimination of abnormal embryos. Human Reproduction, vol **9**(7): pp. 1204-1207
- Emera, D., Romero, R., and Wagner, G., 2012; The evolution of menstruation: A new model for genetic assimilation. Bioessays. Vol 34(1): pp. 26-35.
- Evans, J., Salamonsen, L. A., 2012: Inflammation, leucocytes and menstruation. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, vol. 13: pp. 277-288
- Finn C. A, Pope M., 1984; Vascular and cellular changes in the decidualized endometrium of the ovariectomized mouse following cessation of hormone treatment: a possible model for menstruation. J Endocrinol, vol.100: pp. 295-300
- O'Connell, B.A., Moritz, K. M., Walker, D. W., Dickinson, H., 2013; Sexually dimorphic placental development throughout gestation in the spiny mouse (Acomys cahirinus). Placenta, 34(2): pp. 119-126.
- Peitz, B., 1981; The Oestrous Cycle of the Spiny Mouse (Acomys cahirinus). Journal of Reproduction and Fertility, vol. 61: pp. 453-459.

CUORI DI RODITORI IN LETARGO, MODELLI PER LA MESSA A PUNTO DI NUOVE STRATEGIE DI CARDIOPROTEZIONE IN FARMACOLOGIA, CARDIOCHIRURGIA E TRANSPLANTOLOGIA

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Biologia dell'ibernazione e del letargo

Letargo e ibernazione, strategie straordinarie che assicurano la sopravvivenza di certi invertebrati e vertebrati durante l'inverno, sono risposte adattative alla prolungata assenza di cibo e a climi estremamente rigidi. Il letargo (*true hibernation*) è una forma di vita latente, sospesa, più estrema dell'ibernazione, e comporta un profondo rallentamento, reversibile, delle funzioni vitali fondamentali. Il letargo (dal greco *λήταργος*, termine formato da *λήτη* cioè "oblio" e *αργός* ossia "inerte") è stato impropriamente chiamato ibernazione (dal latino *hibernum*) perché le prime osservazioni su tale fenomeno furono effettuate su mammiferi (ghiri e marmotte) che cadono in uno stato di profonda quiescenza/letargo durante i mesi invernali.

Marmotte, istrici, ghiri e ricci cadono in letargo; orsi bruni - la cui temperatura corporea scende da 37 a 31°C - orsi polari e tassi presentano periodi di immobilità invernale che definiremmo, più propriamente, ibernazione. Negli animali che entrano in letargo, come anfibi, rettili e mammiferi (tassi, istrici, ghiri, scoiattoli, marmotte), la temperatura corporea non si abbassa di solito di molti gradi centigradi, e ciò li mette in grado di tornare attivi in poco tempo.

L'ibernazione è un periodo di torpore profondo che può durare settimane o mesi, comune in Roditori, Insettivori e Chirotteri, che durante l'estate accumulano riserve energetiche che permettono loro di superare i lunghi inverni senza alimentarsi. L'ibernazione differisce dal letargo perché non è un vero lungo sonno: gli animali ibernanti possono reagire a stimoli, seppure in modo torpido; possono svegliarsi, di tanto in tanto, per defecare e svuotare la vescica e la loro temperatura corporea può scendere anche di 20°C rispetto alla norma, mantenendosi a volte appena 1°C sopra la temperatura ambientale, con notevole risparmio energetico.

Tutti i veri ibernanti sono mammiferi di medi taglia, che pesano almeno alcune centinaia di grammi, ma non sono troppo piccoli, altrimenti non avrebbero riserve sufficienti per sopravvivere. L'animale in ibernazione è in equilibrio su un confine in bilico tra il mantenimento della vita in condizioni che rendono possibile il ricupero dall'ibernazione e la drastica riduzione del metabolismo che può portarlo alla morte. Numerosi processi cellulari, come trascrizione, trasduzione del segnale, omeostasi degli ioni sono molto rallentati in queste condizioni estreme.

Durante l'ibernazione e il letargo, la temperatura corporea può scendere drasticamente a valori sotto i 10 e anche sotto gli 0°C, rispettivamente, fino a raggiungere i -2,9 °C, che sono temperature molto inferiori a quelle che causano aritmie ventricolari e arresto ipotermico del cuore dei mammiferi che non vanno in letargo (Andrews, 1997). A temperature così basse, gli animali ibernanti/in letargo sopravvivono grazie all'elevata concentrazione ematica di varie sostanze, come urea, acido urico e ioni, che impediscono all'acqua, presente nel plasma sanguigno e nel citoplasma delle cellule, di cristallizzare e di rompere le membrane cellulari, danneggiando i tessuti. In queste condizioni, il sangue non è più in grado di cedere ossigeno ai tessuti e ciò indurrebbe lo stato di letargo e, soprattutto, quello di ibernazione.

Il letargo è caratterizzato da profonda depressione del metabolismo basale, che può scen-

dere fino allo 0,2% dei valori normali, del consumo di ossigeno e dei ritmi cardiaco (1-2 pulsazioni/min.) e respiratorio. Durante il letargo, ma anche nell'ibernazione, gli animali consumano le abbondanti riserve di grasso accumulate nei mesi di vita attiva. Gli animali ibernanti e quelli che vanno in letargo possono, non solo sopravvivere a questi estremi fisiologici, ma anche tornare alle attività dello stato normotermico, senza subire i classici danni da riperfusione/riscaldamento o altri effetti nocivi, e questa è una caratteristica che ne fa eccellenti modelli animali per lo studio del trasferimento di meccanismi naturali cardioprotettivi alla medicina umana (Bouma, 2012).

Il cuore dei mammiferi ibernanti/in letargo

Il cuore dei mammiferi è un organo dinamico che può crescere e adattarsi a nuove esigenze per favorire cambiamenti nel suo carico di lavoro. Durante lo sviluppo, e in risposta a stimoli fisiologici, a insulti patologici o a fronte di un'aumentata tensione della parete ventricolare, il cuore va incontro a un ingrossamento ipertrofico, risposta adattativa caratterizzata da un aumento del volume di ogni singolo cardiomiocita.

L'entrata in letargo comporta serie conseguenze per il cuore, che deve continuare a battere, resistendo alle aritmie cardiache ventricolari. Sebbene il ritmo cardiaco sia drasticamente rallentato durante il letargo - può scendere all'1,5-2,5% del ritmo eutermico - la forza contrattile del muscolo cardiaco deve aumentare per vincere la viscosità del sangue che, a temperature così basse, diventa più denso. Se non intervengono meccanismi adattativi, il rischio è che si instauri un'ipertrofia cardiaca che, se è prolungata, può portare a una cardiomiopatia dilatativa, principale indicatore di una progressiva patologia cardiaca che sfocia spesso nell'insufficienza cardiaca, caratterizzata dal calo della *performance* della contrattilità del miocardio, associata a profonde alterazioni nella gestione del Ca^{2+} endocellulare.

Un numero crescente di *pathway* di segnali molecolari intracellulari sono stati caratterizzati come trasduttori/regolatori critici della risposta ipertrofica in mammiferi ibernanti/in letargo e ne sono stati chiariti i meccanismi grazie ai quali le alterazioni della movimentazione del calcio sono associate alla progressione dell'insufficienza cardiaca. E' ormai accettato, infatti, che esista un diversificato *set* di *pathway* di segnali intracellulari che caratterizzano la natura multifattoriale del programma ipertrofico. Tra i principali *pathway* descritte, troviamo quelle delle isoforme specifiche della proteina-G, delle GTPasi di basso peso molecolare (Ras, RhoA e Rac), delle cascate di *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), della proteina chinasi C, della calcineurina, della proteina gp130 trasduttrice di segnale e attivatrice della trascrizione, delle *pathway* del recettore *dell'insulin-like growth factor I,* del *fibroblast growth factor* e del *transforming growth factor* β-receptor. Ognuno di queste *pathway* di segnali è implicata come trasduttore ipertrofico, circostanza che, nell'insieme, contribuisce alla composizione di un nuovo paradigma, in cui molteplici *pathway* operano in concerto per orchestrare una risposta ipertrofica (Molkentin, 2001). La risposta adattativa ipertrofica, cui il miocardio va incontro a seguito di un'accresciuta tensione della parete ventricolare o di stimoli neuro-umorali, aumenta temporaneamente la funzione di pompa del miocardio ma, sebbene questa sia inizialmente benefica, una persistente ipertrofia cardiaca può condurre allo scompenso cardiaco e a una cardiomiopatia dilatativa.

Calcineurina[1] è uno dei principali regolatori fisiologici della risposta ipertrofica cardiaca: sebbene sia, di per sé, sufficiente a promuovere, sia *in vitro* che *in vivo*, l'ipertrofia del cardiomiocita, l'indispensabilità del suo ruolo di mediatore dell'ipertrofia è tuttora dibattuta. Infatti, risultati dell'inibizione farmacologica di calcineurina con ciclosporina A[2] e con FK506[3] (tacrolimus) inducono a pensare che calcineurina ricopra un ruolo in molti, ma non in tutti, i modelli animali di ipertrofia del miocardio o di cardiomiopatia (Molkentin, 2000). Calcineurina, oltre a giocare il ruolo di potenziale regolatore focale dell'ipertrofia dei cardiomiociti, risponde anche all'alterata gestione del

Ca^{2+}: attivata dall'aumento della [Ca^{2+}] intracellulare, calcineurina (*calmodulin-activated serine/treonine protein phosphatase*) media la risposta ipertrofica tramite il suo effettore trascrizionale *down-stream* NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), defosforilandolo e promuovendone il passaggio dal citoplasma al nucleo, previo legame con un'importina (proteina citoplasmatica che riconosce determinate sequenze di aminoacidi basici sulle proteine destinate al nucleo). Entrato nel nucleo, NFAT, oltre a legarsi a tratti del DNA per la produzione di molecole che attivano i linfociti T, si associa a un fattore trascrizionale che regola alcuni geni correlati all'ipertrofia cardiaca. Se non è defosforilato dalla calcineurina, NFAT non può entrare nel nucleo e innescare l'espressione di questi geni. Studi dimostrano che calcineurina, oltre a mediare l'ipertrofia cardiaca, ne promuove la progressione verso l'insufficienza cardiaca (Wilkins, 2004). Inoltre, evidenze scientifiche dimostrano che calcineurina e MAPK sono co-regolatori dell'ipertrofia reattiva: le *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) e le *p38 MAPK-activated protein kinases* mediano la cardiomiopatia dilatativa, mentre le *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) regolano l'ipertrofia. Si è poi dimostrato che le azioni delle *pathway* dei segnali di calcineurina e MAPK sono co-dipendenti, di modo che l'attivazione della sola calcineurina nei miociti porta alla *up-regulation* nel segnale di ERK e MAPK e alla *down-regulation* del segnale delle p38 chinasi. Al contrario, l'attivazione delle sole ERK o delle p38 chinasi nei cardiomiociti induce la *down-regulation* dell'efficacia di calcineurina nel defosforilare NFAT, la cui traslocazione nucleare risulta così inibita (Molkentin, 2004).

Meccanismi proteomici di cardioprotezione in *Marmota monax* durante il letargo

Le tecnologie di sequenziamento del genoma forniscono ai biologi molecolari metodologie collaudate per lo studio degli eventi molecolari che si verificano durante il rimodellamento del metabolismo, nell'induzione dell'ipotermia e nel mantenimento delle funzioni vitali. Lo scopo di tali studi è l'induzione di analoghi processi in mammiferi che non vanno in letargo: con finalità sperimentali nel topo e nel coniglio, e terapeutiche nell'uomo

.

Ci soffermeremo su due modelli animali: il primo riguarda 1) i meccanismi proteomici di cardioprotezione, 2) la vasodilatazione NO-dipendente e 3) la gestione del Ca^{2+} endocellulare nel miocardio di *Marmota monax* (fig. 1) durante il letargo; il secondo riguarda i meccanismi adattativi cardiaci in *Spermophilus tridecemlineatus* (fig. 2) in letargo, tramite analisi digitale del suo trascrittoma.

Fig. 1. *Marmota monax* (da: Wikipedia.org)

Fig. 2. *Spermophilus tridecemlineatus* (da: uniprot.org)

Marmota monax, o *woodchuch,* vive in nord America: il suo areale geografico si estende dall'Alaska centro-orientale e dalla costa canadese del Pacifico, verso est, a cavallo dei Grandi Laghi e del confine tra Canada e Stati Uniti, dal golfo dell'estuario del San Lorenzo e dall'isola di Terranova verso sud, fino all'Alabama e alle regioni centrali della costa nord-atlantica. Durante il letargo, il ritmo respiratorio di *Marmota monax* scende a 1 respiro/min e quello cardiaco rallenta fino a 4 battiti/min, mentre la temperatura corporea crolla drasticamente. Quando è in letargo, questa marmotta sviluppa una naturale resistenza alla disfunzione cardiaca correlata al sovraccarico di Ca^{2+} e una vasodilatazione NO-dipendente, che sostiene il flusso sanguigno del miocardio in queste condizioni estreme. Per chiarire il/i meccanismo/i molecolare/i che media/no la cardioprotezione nei *woodchuck* in letargo, sono stati studiati i cambiamenti che si verificano nel loro proteoma cardiaco. Sono stati usati *tag* isobarici per realizzare un approccio di quantificazione relativa ed assoluta (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*, iTRAQ[4] (fig. 3). Le differenze più significative riscontrate nel proteoma cardiaco di *woodchuck* ibernanti, rispetto al proteoma delle marmotte estivanti, riguardano la *up-regulation* della catalasi antiossidante (trasforma H_2O_2, che si forma quando gli acidi grassi sono convertiti in energia, in H_2O e O_2, impedendo la formazione di emboli gassosi di CO_2) e l'inibizione della risposta allo stress del reticolo endoplasmico, tramite la *down-regulation* di GRP78 (*endoplasmic reticulum stress suppressive protein*: protegge dallo stress ossidativo e stabilizza l'omeostasi del Ca^{2+}; appartiene a*lla famiglia di chaperon molecolari necessari per l'integrità del reticolo endoplasmico),* meccanismi che potrebbero essere responsabili dell'adattamento e della protezione del cuore dei *woodchuck* in letargo. Inoltre, durante questo periodo, sono risultati drammaticamente sovra-regolati parametri quali i *network* di proteine attinenti al segnale del NO, la risposta di fase acuta (risposta di un organismo a perturbazioni della sua omeostasi), i regolatori trascrizionali CREB (*cAMP response element-binding protein*) e NFAT, la proteina chinasi A e il segnale α-adrenergico (fig. 3) (Dobson, 2004). Anche in *Marmota monax*, dunque, aumenti della concentrazione del Ca^{2+} citoplasmatico attivano calcineurina che media la risposta ipertrofica tramite il suo effettore trascrizionale NFAT. Il significato complessivo di questi risultati è che il profilo di espressione delle proteine, rilevabile dal proteoma cardiaco di *woodchuck* in letargo, è alterato in modo da opporsi agli effetti nocivi dell'ipertrofia cardiaca. Questi meccanismi adattativi possono fornire suggerimenti originali per indirizzare gli studi sulla protezione del miocardio di animali che non vanno in letargo, in special modo se umani, dalle disfunzioni indotte dallo stress ipotermico (incidenti in montagna, naufragi) e dai danni da ischemia-riperfusione del miocardio in transplantologia (Li, 2013).

Vasodilatazione NO-dipendente nel miocardio di *Marmota monax* durante il letargo

Pazienti affetti da coronaropatia cronica possono presentare una funzione miocardica regionale depressa, ricuperabile con rivascolarizzazione. Questo stato patologico è stato chiamato "*miocardio ibernante*", perché si pensava che il flusso sanguigno miocardico fosse cronicamente ridotto e che gli animali ibernanti/in letargo avessero funzione e flusso cardiaco sotto-regolati. Per trovare l'anello mancante in questo sillogismo, si sono misurati il flusso sanguigno e altri parametri cardiaci in *Marmota monax* durante il letargo.

I *woodchuck* sono stati chirurgicamente "strumentalizzati", in anestesia, con l'impianto di flussimetri, cannule e cateteri cronici, e i parametri emodinamici sono stati registrati prima della sistemazione delle marmotte in ibernacoli e dopo che si erano stabilizzate nello stato di ibernazione. La temperatura corporea è scesa da 35,7 a 13,4°C, il ritmo cardiaco, la pressione aortica media e il valore della gittata cardiaca (dP) del ventricolo sinistro sono diminuiti significativamente ($p<0,05$) del 67, 36 e 61%, rispettivamente. Sebbene il flusso sanguigno renale,

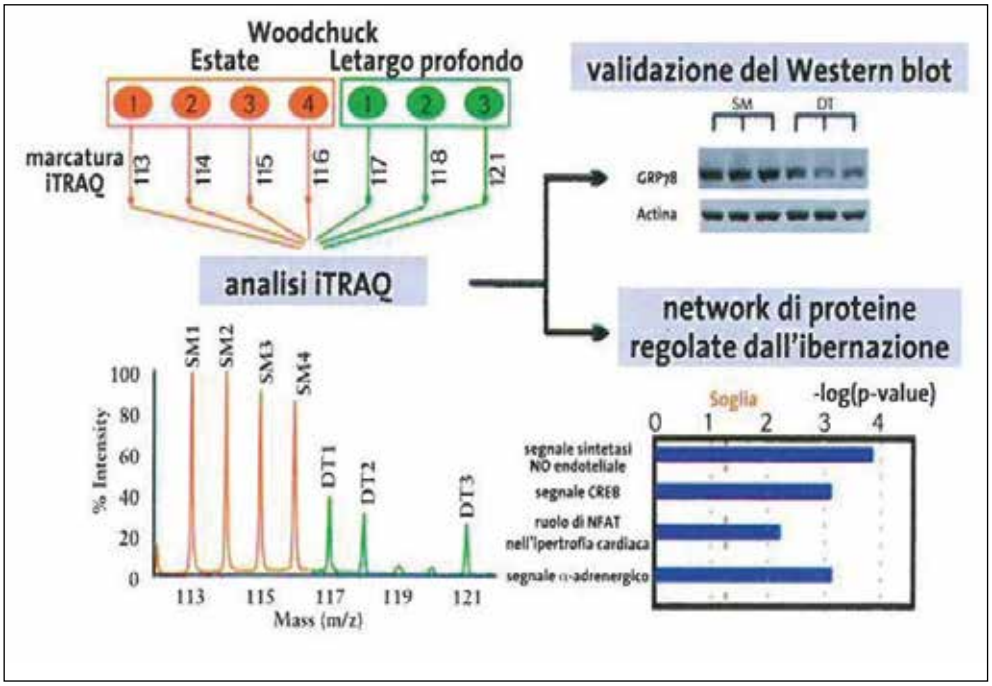


Fig. 3. Strategia dei meccanismi proteomici di cardioprotezione durante il letargo in *Marmota monax* (da: Li, H., *et al*., 2013; Proteomic mechanisms of Cardioprotection during Mammalian Hibernation in Woodchucks, *Marota monax*; J. of Proteome Research, vol. 12: pp. 4221-4229)

misurato con microsfere radioattive, fosse calato del 95% e l'output cardiaco complessivo fosse caduto dell'84%, sorprendentemente il flusso sanguigno transmurale del miocardio non è diminuito in modo significativo durante il letargo (0,70 ml/min/g) rispetto allo stato attivo (0,84ml/min/g). Da notare che, durante il letargo, l'inibizione della sintetasi dell'ossido nitrico (NO) è significativamente diminuita nel flusso sanguigno del miocardio (-41%, $p<0,05$), mentre è aumentata nella resistenza vascolare coronarica (+90%, da 77 mmHg min g/ml).

Questi dati dimostrano che il letargo induce una *down-regulation* del flusso sanguigno negli organi viscerali (ad esempio nei reni), mentre assicura un sorprendente mantenimento del flusso sanguigno nel miocardio, chiaramente grazie a un meccanismo mediato dal NO (Kudel, 2003).

Ca^{2+} cellulare e cardioprotezione in *Marmota monax* in letargo

I mammiferi che non possono andare in letargo, se esposti a condizioni climatiche estreme, sviluppano disfunzioni ventricolari e aritmie, mentre quelli che vanno in letargo sopravvivono, grazie ad una notevole resistenza a temperature corporee molto basse. Per studiare questo cambiamento adattativo, sono state confrontate le proprietà contrattili ed elettrofisiologiche di miociti prelevati dal ventricolo sinistro di *woodchuck* ibernanti (HB) con quelle di

miociti di marmotte estivanti (ES). I principali risultati di questa ricerca sono stati: 1) la durata del potenziale di azione nei miociti HB era significativamente più breve che nei miociti ES, ma l'ampiezza della contrazione di picco rimaneva immutata; 2) i miociti HB presentavano diminuita densità della corrente di Ca^{2+} di tipo L (I(Ca)) (-33%) e un'inattivazione della I(Ca) 2 volte più veloce, ma nessun cambiamento nel rapporto corrente-voltaggio [I canali del Ca^{2+} di tipo L sono voltaggio-dipendenti: "L" sta per *long lasting*, ovvero attivazione di lunga durata. Questi canali sono responsabili tra l'altro, dell'abbinamento eccitazione-contrazione del muscolo cardiaco]; 3) non sono stati riscontrati cambiamenti nella densità delle correnti di K^+ rettificante verso l'interno, di K^+ transiente verso l'esterno o di scambio Na^+/Ca^{2+}, ma i miociti HB presentavano un aumentato contenuto di Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmatico, stimato con i valori della corrente di scambio Na^+/Ca^{2+} indotta con caffeina; 4) l'espressione della subunità alpha(1C) del canale del Ca^{2+} di tipo L era diminuita del 30% nei cuori HB vs i cuori ES, e 5) mRNA e i livelli di proteine del reticolo sarco(endo)plasmatico, della Ca^{2+}-ATPasi 2a (SERCA2a), del fosfolambano e dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} mostravano un *pattern* consistente con le misurazioni funzionali: nei cardiomiociti HB, SERCA2a era aumentata e fosfolambano diminuito rispetto a quelli ES, in assenza di cambiamenti dello scambiatore Na^+/Ca^{2+}. Così, la ridotta densità di canali del Ca^{2+} e la più veloce inattivazione della I(Ca), accoppiate all'aumentato rilascio del Ca^{2+} del reticolo sarcoplasmatico, possono supportare potenziali di azione più brevi con contrattilità sostenuta nei cuori HB.

Questi cambiamenti possono spiegare la naturale resistenza del cuore di *woodchuck* alla disfunzione ventricolare correlata al sovraccarico di Ca^{2+} e indicare un importante meccanismo protettivo durante il letargo (Yatani, 2004).

Il trascrittoma del cardiomiocita di *Spermophilus tridecemlineatus* in letargo

La sopravvivenza a temperature vicine al congelamento corporeo e al ridotto flusso sanguigno durante l'ibernazione/il letargo è verosimilmente il risultato di cambiamenti nell'espressione di geni specifici. E' stata fatta un'indagine esaustiva sugli RNA messaggeri (mRNA) nel cuore dello scoiattolo del Nebraska (*Spermophilus tridecemlineatus*, o *Ictidomys tridecemlineatus*) prima del, e durante il letargo.

Appartenente a un genere parafiletico delle marmotte, come queste fa parte della famiglia *Sciuridae* e deve il nome alle tipiche strisce longitudinali, alternate chiare/scure, della pelliccia, con le striature scure punteggiate da spot chiari (fig. 2). L'areale geografico di questo scoiattolo di terra (*ground squirrel*) si estende dall'Ohio al Montana e all'Arizona, dall'Alberta e dal Saskatchewan (Canada) verso sud, fino alla costa del Texas. Va in letargo in tane sotterranee, da agosto a marzo, ma le date variano al variare della latitudine; cade in un vero letargo, perché la sua temperatura corporea scende appena al di sopra del congelamento e il ritmo cardiaco scende da 200 a 20 battiti/min. L'analisi digitale del trascrittoma durante il letargo è stata fatta nel cuore perché è un organo contrattile che deve continuare a lavorare, nonostante la temperatura corporea di 5°C e l'assoluta, prolungata mancanza di cibo. E' stato usato il *digital gene expression assay,* che richiede il sequenziamento ad alta performanza di librerie direzionali di cDNA ottenute da cuori di scoiattoli estivanti e ibernanti, per determinare l'identità e la frequenza di 3532 *expressed sequence tag* (EST: brevi sequenze di DNA, corrispondenti alle regioni terminali di sequenze di cDNA più lunghe).

L'analisi statistica dei profili di espressione cardiaci degli animali estivanti e di quelli ibernanti indica una regolazione differenziale di 48 geni basata su un valore soglia di $p \leq 0{,}03$. Molti dei geni differenzialmente espressi, indentificati in questo screening, codificano per proteine che, verosimilmente, sono coinvolte nelle funzioni cardiache non interrotte durante il letargo, comprese quelle implicate nel metabolismo, nella contrattilità, nella movimentazione del Ca^{2+} e nella catalisi a basse temperature.

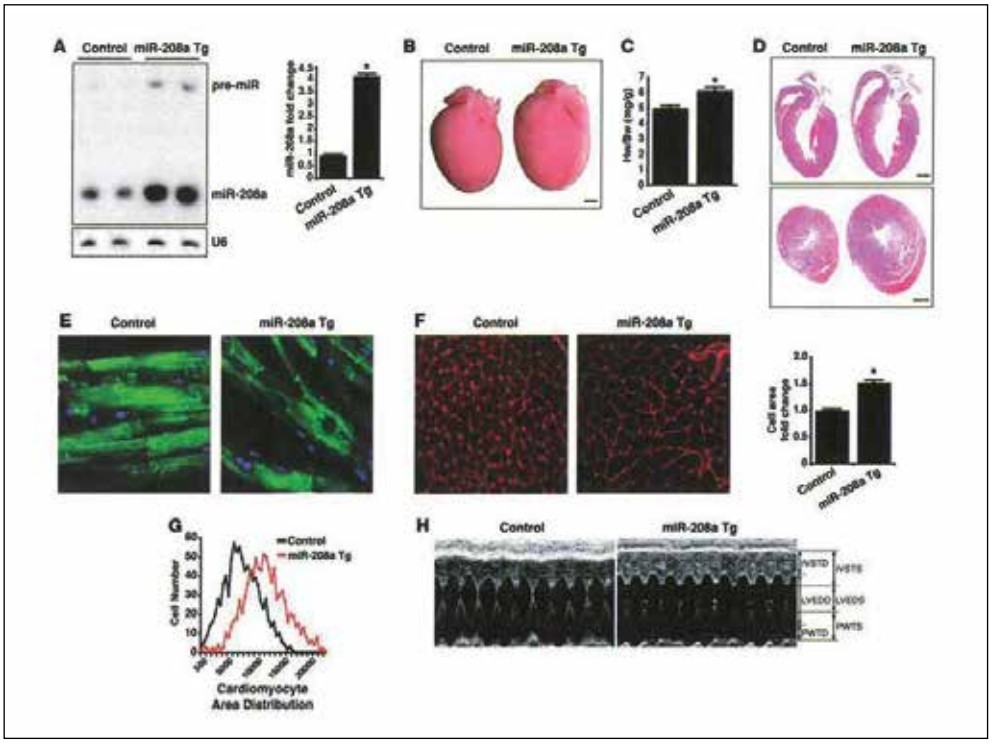


Fig. 4. Crescita ipertrofica del cuore di topi transgenici miR-208a (A) A sinistra: il Northern blot mostra un aumento di circa 4x dell'espressione di miR-208a nei cuori di topi Tg, rispetto ai cuori della nidiata di controllo. A destra: analisi quantitativa dell'aumento dell'espressione di miR-208a nei topi transgenici in confronto agli animali di controllo (*P<0,001). (B) La morfologia macroscopica dei cuori miR-208a transgenici è ingrossata in confronto ai cuori di controllo (scala grafica: 1 mm). (C) Il rapporto peso del cuore/peso corporeo (Hw/Bw) in topi Tg miR-208a di 4 mesi di età (n=22) è risultato significativamente più elevato che nei controlli (n=19) ($P<7\times10^{-7}$). (D) Vista macroscopica di sezioni istologiche colorate con ematossilina-eosina (in alto: sezione sagittale, in basso: sezione trasversale) di cuori di topi di controllo (a sinistra) e di topi miR-208a Tg (a destra) (scala grafica: 1 mm). (E) Struttura dei sarcomeri (unità contrattili del tessuto muscolare striato, costituite da due tipi di filamenti: quelli sottili di actina e quelli spessi di miosina) di cardiomiociti visualizzati con colorazione immunoistochimica con desmina in sezioni istologiche. (F) Sezioni istologiche colorate con agglutinina di germe di grano coniugata con tetrametilrodamina (TRITC) per determinare le dimensioni delle cellule. I cardiomiociti dei cuori dei topi miR-208a Tg (n=930) sono risultati significativamente più grandi dei cardiomiociti dei topi di controllo (n= 26) ($*P<9\times10^{-50}$). (G) Confronto tra l'area di distribuzione dei cardiomiociti dei cuori dei topi di controllo e dei topi miR-208a Tg. (H) Esempi di ecocardiografie M-mode ottenuti da topi di controllo e topi miR-208a Tg svegli. IVSTD: spessore del setto interventricolare in diastole; IVSTS: spessore del setto interventricolare in sistole; PWTD: spessore della parete posteriore in diastole; PWTS: spessore della parete posteriore in sistole; LVEDD: dimensione del ventricolo sinistro a fine diastole; LVESD: dimensione del ventricolo sinistro a fine sistole. (da: Callis, T. E., *et al*., 2009; MicroRNA-208 is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice; J. Clin. Invest., vol. 119: pp. 2772-2776)

Un campione di geni, iper-espressi nel cuore di questi scoiattoli in letargo, comprende i geni che codificano per la fosfofruttochinasi, la triacilglicerolo lipasi pancreatica, la piruvato deidrogenasi chinasi 4 (PDK4), l'aldolasi A, la Ca^{2+}-ATPasi del reticolo sarco(endo) plasmatico (SERCA2a[5], pompa intracellulare localizzata nel reticolo sarcoplasmatico), per la titina (o connettina, proteina gigante che agisce da molla molecolare, responsabile dell'elasticità muscolare) e la *four-and-a-half LIM domains protein 2* (FHL2, proteina con molteplici funzioni, tra le quali lo sviluppo del sistema cardiocircolatorio).

Tra i geni che mostrano ridotti livelli di espressione durante il letargo, troviamo quelli che codificano per la proteina-1 associata alla chinasi-2 ciclina-dipendente (CDK2aP1), per la troponina C (proteina presente nei muscoli, di fondamentale importanza nella fase di eccitazione-contrazione della muscolatura scheletrica), per la proteina chinasi II-Ca^{2+}/calmodulina-dipendente (CaMKII), per la calmodulina, per 4 subunità della citocromo-C-ossidasi e per il fosfolambano (Brauch, 2009).

Il fosfolambano è una proteina del miocardio coinvolta nell'omeostasi del calcio: il Ca^{2+} è pompato nel reticolo da un trasportatore, la cui funzione è regolata dal fosfolambano, che inibisce la pompa quando è defosforilato e la libera quando è fosforilato. La fosforilazione del fosfolambano è accresciuta dalla stimolazione del simpatico, che accelera il rilasciamento del cuore (effetto lusitropo positivo: è la velocità di decontrazione, o rilasciamento diastolico, che segue la contrazione sistolica).

Molte specie di mammiferi, ibernanti/in letargo, sopravvivono agli inverni gelidi e privi di cibo delle zone temperate, deprimendo i ritmi metabolici al solo 2-4% dei valori della vita attiva. Al momento del risveglio dal letargo, nei primi giorni di primavera, questi animali mostrano minore sintomatologia da atrofia riferibile al lungo periodo di inerzia del sistema muscolare scheletrico, di quanto si rilevi nelle specie che non vanno in letargo, e non mostrano affatto segni di danni da ischemia-riperfusione (Carey, 2003).

E' interessante notare che le specie ibernanti si trovano distribuite un po' in tutti gli ordini della classe dei Mammiferi. Si pensa che gli adattamenti fisiologici che intervengono negli animali delle specie che vanno in ibernazione/letargo, appena prima e durante il letargo, siano causati da cambiamenti nell'espressione di geni specifici comuni a tutti i mammiferi, piuttosto che attraverso l'attivazione di un ipotetico gruppo di geni presente esclusivamente nei genomi delle specie ibernanti (Srere, 1992). Nello studio del trascrittoma del cuore di *Spermophilus tridecemlineatus*, è stata fatta un'analisi digitale dell'espressione genica, basata su cDNA, per identificare geni differenzialmente regolati durante il letargo. A questo scopo sono stati sequenziati casualmente oltre 4000 cloni di cDNA da due *library* non normalizzate: una creata da cuori di scoiattoli estivanti, l'altra da cuori di scoiattoli in letargo. Le EST sono state poi identificate tramite BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), programma di allineamento locale delle sequenze. Le EST combacianti con, o eccedenti, criteri di allineamento specifici sono state tabulate per determinare il numero totale di ogni gene nei due stati fisiologici. La probabilità che specifici geni fossero differenzialmente espressi nelle due condizioni fisiologiche è stata calcolata usando un test statistico progettato per cogliere regolazioni differenziali nei test di espressione genica digitale. Almeno una sequenza EST rappresentativa, presa da ogni singola identità genica determinata dai criteri di allineamento per un'identificazione genica positiva, è stata sottoposta al *database* per EST. Quest'analisi ha indicato che sono 48 i geni differenzialmente regolati nel cuore in letargo: di questi, 37 mostravano un'espressione più alta nel cuore di scoiattoli estivanti, mentre 11 erano maggiormente espressi nel cuore di animali in letargo. Sulla base di questi risultati, è stato sviluppato un modello complesso di funzione cardiaca che indica il ruolo di questi geni differenzilamente espressi nell'alterare la contrattilità, il metabolismo glicidico e la gestione del calcio nel cuore in letargo (Brauch, 2009).

Modello murino di regolazione dell'ipertrofia e conduzione cardiache

La funzione cardiaca e il rimodellamento sono strettamente correlati a una complessa regolazione genica. La maggior parte delle conoscenze attuali sul controllo dell'espressione genica cardiaca riguarda il livello trascrizionale, ma recenti scoperte hanno spostato l'attenzione sull'azione di alcuni microRNA (miRNA) a livello post-trascrizionale. Non siamo al corrente di ricerche sull'eventuale ruolo/espressione dei miRNA nel cuore di animali in letargo, o espiantato e in attesa di trapianto, ma crediamo che queste brevi sequenze di RNA, implicate nell'ipertrofia e nella conduzione cardiache, possano offrire un originale punto di attacco per terapie farmacologiche e strategie cardioprotettive in chirurgia e transplantologia cardiache.

I miRNA sono una classe, evoluzionisticamente conservata, di polimeri di 20-22 nucleotidi, attivi principalmente nella regolazione trascrizionale e post-trascrizionale dell'espressione genica, codificata dal DNA nucleare: funzionano tramite accoppiamento-base con sequenze complementari delle molecole di RNA messaggero (mRNA), di solito con conseguente silenziamento genico tramite repressione traduzionale (blocco della formazione del complesso di inizio con il ribosoma) o degradazione dell'mRNA bersaglio. Sono stati studiati il ruolo e i meccanismi molecolari della famiglia miR-208 di microRNA, nella fisiologia cardiaca di topi (*Mus musculus*) adulti. I risultati mostrano che miR-208a e miR-208b, codificati rispettivamente all'interno dell'introne 29 del gene Myh6 (*alpha-cardiac muscle myosin heavy chain*) e dell'introne 31 del gene Myh7 (*beta-cardiac muscle myosin heavy chain*), sono differenzialmente espressi nel cuore di topo, parallelamente all'espressione dei geni che li ospitano. miR-208a, repressore di alcuni geni anti-ipertrofici, se sovra-espresso nel cuore di topi transgenici, è sufficiente a indurre una crescita cardiaca ipertrofica che esita in una marcata repressione dei *target* regolatori di miR-208a, *tyroid hormone-associated protein 1* e *myostatin*, regolatori negativi della crescita muscolare e dell'ipertrofia cardiaca. Studi in topi transgenici miR-208a indicano che l'espressione di miR-208a è sufficiente a indurre aritmie ventricolari (fig. 4). L'analisi di topi privi di miR-208a dimostra che questo miRNA è necessario per una corretta conduzione cardiaca e per l'espressione di fattori cardiaci di trascrizione come la *homeodomain-only protein* (associata a ipertrofia cardiaca, dilatazione e fibrosi), la proteina GATA4 (fattore di trascrizione con un ruolo critico nella regolazione del *folding* rostro-caudale e latero-ventrale dell'embrione, necessari per una normale morfogenesi cardiaca) e la *gap junction protein connexin 40* (essenziale in molti processi fisiologici, tra i quali la depolarizzazione coordinata del muscolo cardiaco) (Callis, 2009).

Per appurare se la sovra-espressione di miR-208a perturba la conduzione cardiaca, sono stati registrati gli ECG di superficie di topi transgenici miR-208a dell'età di 1-6 mesi: l'analisi dei loro tracciati ECG mostra l'intervallo PR (tempo intercorso tra l'inizio della depolarizzazione atriale e l'inizio della depolarizzazione ventricolare) significativamente più prolungato che nell'ECG dei topi di controllo, alterazione che in clinica umana è considerata come il I° grado del blocco atrio-ventricolare. E' interessante notare che circa il 30% dei topi transgenici miR-208a presentava anche un II° grado di blocchi atrio-ventricolari, nei quali uno o più impulsi elettrici non riescono a passare, attraverso il nodo atrio-ventricolare, dagli atrii ai ventricoli, provocando malfunzionamento/arresto della contrazione ventricolare. I blocchi di II° grado compaiono nei tracciati ECG come onde P (depolarizzazione atriale) cui non seguono complessi QRS (depolarizzazione ventricolare).

Lo sviluppo di blocchi cardiaci progressivi nei topi transgenici miR-208a dimostra che la sovra-espressione di miR-208a induce anomalie nella conduzione cardiaca e suggerisce un suo coinvolgimento nella regolazione del sistema di conduzione cardiaco. I risultati di questo studio dimostrano l'esistenza di nuovi meccanismi che modulano l'ipertrofia cardiaca e la conduzione elettrica nel miocardio. L'inibizione farmacologica di miR-208 e di altri miRNA

ad azione similare, potrebbe rappresentare originali opportunità terapeutiche per rimuovere/attenuare alcuni dei disordini patologici associati all'ipertrofia cardiaca di qualunque origine, compresa quella da scongelamento-riperfusione. Non solo, la concentrazione plasmatica di miR-208a può essere un utile indicatore diagnostico di danno cardiaco e il profilo plasmatico dei miRNA potrebbe aiutare nell'identificare promettenti biomarkers di varie patologie cardiache (Callis, 2009).

Cardioprotezione

Il termine "cardioprotezione" comprende meccanismi e strumenti adattativi e compensativi che, direttamente o indirettamente, contribuiscono alla protezione/preservazione del cuore tramite la riduzione/prevenzione del danno cardiaco. In questa accezione, il termine cardioprotezione comprende la prevenzione primaria e secondaria della patologia coronarica, le procedure cardiochirurgiche e la lisi dei trombi nell'infarto acuto del miocardio. I meccanismi cronici compensano condizioni potenzialmente dannose di lunga durata, come l'aumento del sovraccarico da lavoro o l'ischemia, ma possono indurre effetti collaterali avversi. Attivazione neuro-umorale, ipertrofia del ventricolo sinistro e dilatazione ventricolare sinistra - che operano rimodellando il cuore infartuato, la prima nell'area non infartuata, la seconda nell'area infartuata - e l'ibernazione sono meccanismi cronici di compensazione. Sebbene il letargo possa ridurre e/o ritardare il danno cellulare e la necrosi del miocardio nella regione ischemica del cuore, la perdita di miociti contrattili nel miocardio ibernante incrementa il carico sul miocardio normale residuante. A differenza dei meccanismi adattativi acuti, quelli cronici evocano, quindi, non solo effetti cardioprotettivi, ma anche effetti collaterali indesiderati. Il rapporto, tra effetti cardioprotettivi favorevoli e effetti collaterali nocivi, dipende dall'attivazione del meccanismo compensativo. In genere, più un meccanismo compensativo è attivato, più gravi sono le conseguenze dannose (Kübler, 1996).

Ricadute terapeutiche, chirurgiche e diagnostiche

La cardiochirurgia continua a essere limitata dall'incapacità di assicurare una completa protezione del miocardio dal danno da ischemia/riperfusione, mentre il trapianto cardiaco trova il principale ostacolo nella cronica carenza di donatori. Una preservazione extracorporea più prolungata potrebbe aumentare numero e distribuzione dei cuori disponibili per il trapianto. La biologia dell'ibernazione/letargo va strettamente in parallelo con la fisiologia cellulare alterata che si registra durante la conservazione dell'organo espiantato.

Quali lezioni si possono apprendere dal cuore dei mammiferi in ibernazione/letargo, per migliorare i metodi routinariamente impiegati per indurre l'arresto cardiaco, per proteggere e preservare il muscolo cardiaco dalle lesioni da ischemia/riperfusione? E' possibile manipolare farmacologicamente il cuore umano durante l'ischemia acuta globale, in modo da indurlo ad agire come quello dei mammiferi in letargo?

Dall'esame delle principali strategie di rallentamento dell'entropia di ibernazione/letargo, il principale, o uno dei principali fattori identificati, è la conservazione del potenziale di membrana. Il potenziale di membrana a riposo dei cuori ibernanti/in letargo si mantiene vicino al suo stato di pre-torpore, a circa -85 mV. Nella chirurgia a cuore aperto, il 99% di tutte le soluzioni di arresto cardio-chirurgico (cardioplegia) impiega elevate concentrazioni di K^+ (>16 mM) che depolarizzano il potenziale di membrana portandolo da -85 a circa -50 mV. Tuttavia, la cardioplegia da depolarizzazione a base di potassio è stata sempre più spesso associata a danni ai cardiomiociti e microvascolari, che portano a una perdita funzionale du-

rante la riperfusione. Ricerche hanno mutuato informazioni dalla biologia dell'ibernazione/letargo ed è stata messa a fuoco una strategia molto differente di cardioplegia, che blocca la membrana vicino al suo potenziale di riposo e deprime di circa il 90% il consumo di ossigeno dai suoi valori basali. La nuova "cardioplegia polarizzante" associa adenosina e lidocaina come combinazione di arresto al posto di un'elevata concentrazione di potassio. Studi sul cuore isolato di ratto mostrano che la cardioplegia da lidocaina, somministrata a 37°C, può arrestare il cuore fino a 4 ore con un ricupero del 70-80% dell'*output* cardiaco, dell'85-100% del ritmo cardiaco, della pressione sistolica e del prodotto ritmo-pressione e del 70-80% del flusso coronarico di base. Al contrario, solo il 14% dei cuori, arrestati con cardioplegia ottenuta con la *cold crystalloid cardioplegic St. Thomas' solution No. 2*[6] sono sopravvissuti 4 ore.

Concludendo, il mantenimento del potenziale di membrana nei pressi del/molto vicino al suo stato di riposo è sicuramente un fattore importante per il cuore in letargo, che può essere di grande utilità nelle strategie dell'induzione dell'arresto cardiaco e della protezione dei cardiomiociti (Dobson, 2004).

In un altro studio, cuori isolati di coniglio (Ordine: Lagomorfi) sono stati conservati in condizioni di semplice ipotermia, o di cardioplegia standard o di cardioplegia con l'aggiunta di 1 mg/kg di D-Alaz-Leu5-enkephalin (DADLE, mima l'ibernazione naturale), o a perfusione per 15 min con DADLE, somministrata alla concentrazione 2 mmolare, 25 minuti prima dell'induzione dell'ischemia cardioplegica. I cuori sono poi stati conservati per 18 ore in ischemica globale a 4°C. La pressione isovolumetrica sviluppata, i flussi coronarici e il consumo di ossigeno del miocardio sono risultati significativamente migliorati dal pre-trattamento con DADLE, dopo conservazione e riperfusione, rispetto ai gruppi di controllo o diversamente trattati. I cuori pre-trattati con DADLE mostravano, all'esame istologico ultrastrutturale, una migliore preservazione dopo la conservazione in condizioni di ischemia prolunagata (Geissler, 2006).

Identificare e accendere/spegnere, in modo sicuro, i geni che rallentano l'entropia, in modo da sotto-regolare il cuore ibernente/letargico e applicare tutto ciò a organi e tessuti umani, rimane la principale sfida per la genomica e la proteomica del futuro. La spiegazione dei meccanismi alla base dell'ibernazione/letargo naturali e indotti farmacologicamente accelereranno lo sviluppo di nuove strategie per il trattamento di una varietà di traumi, stati di stress (grave ipotermia da congelamento) e di approcci (cardio)chirurgici e in transplantologia.

Note

Nota 1. La calcineurina è una proteina con attività fosfatasica, anche nota come PPP3CA (proteina fosfatasi 3) e in passato PP2B. È una serina / treonina fosfatasi controllata dal calcio intracellulare, e originariamente identificata in estratti di cervello dei mammiferi. Questa fosfatasi è stata implicata in una grande varietà di risposte biologiche, compresa l'attivazione dei linfociti, l'attività neuronale, lo sviluppo muscolare, la crescita dei neuriti, e la morfogenesi delle valvole cardiache. È di fondamentale importanza nel meccanismo di *signaling* che porta all'attivazione dei linfociti, soprattutto di quelli T.
Nota 2. La ciclosporina è un farmaco impiegato per prevenire le reazioni di rigetto da trapianto d'organo (cuore, rene, fegato). Agisce deprimendo l'attività del sistema immunitario, sistema deputato a difendere l'organismo da tutto ciò che gli è estraneo. Il farmaco può essere usato anche nel trattamento di altre malattie (p.es. psoriasi, uveite, sindrome nefrosica).
Nota 3. FK506 o tacrolimus è un farmaco immunosoppressore utilizzato soprattutto nei trapianti d'organo per ridurre l'attività del sistema immunitario del paziente e di conseguenza il rischio di rigetto. Ha caratteristiche simili alla ciclosporina, ma è molto più potente a parità di volume.
Nota 4. iTRAQ, modello di marcatura isotopica per la quantificazione di proteine. E' una tecnica di spettrometria di massa usata in genomica quantitativa. L'N-terminale e le ammine delle catene laterali di peptidi e proteine sono marcate covalentemente con diversi gruppi chimici (tag) che sono isobarici o uguali per massa, ma che si frammentano durante la *tandem mass spectrometry* (MS/MS) per dare ioni reporter di masse diverse. I peptidi frammentati producono prodotti ionici sequenza-specifici, che aiutano a determinare la sequenza peptidica come pure i reporter tag, la cui abbondanza riflette il rapporto relativo nei campioni che sono stati combinati.
Nota 5. SERCA2a si trova nel reticolo sarcoplasmatico, all'interno dei miociti. E' una Ca^{2+}-ATPasi che trasferisce ioni Ca^{2+} dal citosol della cellula al lume del reticolo sarcoplasmatico a spese dell'idrolisi di ATP durante il rilassamento muscolare.
Nota 6. In molti centri di cardiochirurgia, la *crystalloid cardioplegia* rimane il metodo di elezione per la protezione del miocardio, grazie ai suoi risultati clinici soddisfacienti. La *cold crystalloid cardioplegia* protegge il miocardio per mezzo dell'ipotermia e dell'arresto elettromeccanico, che riducono la richiesta metabolica del cuore, prolungando la sua tolleranza all'ischemia. In base al meccanismo di azione farmacologico, si possono distinguere due tipi di *cold crystalloid cardioplegic solution*, una di tipo intracellulare e una di tipo extracellulare: la prima non contiene sodio e calcio, o li contiene in basse concentrazioni; la seconda contiene concentrazioni di sodio, calcio e magnesio più elevate. Ambedue le soluzioni contengo potassio 10÷20 mmolare, anestetici locali (lidocaina e procaina) e tamponi come bicarbonato e amminoacidi (Bolling, 1997).

Bibliografia

- Andrews, I. M., 1997; Advances in molecular biology of hibernation in mammals; BioAssays., vol. 29: pp. 431-4402
- Bolling, S. F., Su, T.-P., Childs, K, F., Ning, X-H, Horton, N., Kilgore, K., Oeltgen, P. R., 1997; The use of hibernation induction triggers for cardiac transplant preservation; Transplantation, vol. 63: pp. 326-329
- Verhaag, E.M., Otis, J. P., Heldmaier, G., Swoap, S. J., Strijkstra, A. M., Henning, R. H., and Carey, H. V., 2012; Induction of torpor: Mimicking natural metabolic suppression for biomedical applications; Cellular Physiology, vol. 227: pp. 1285-1290
- Brauch, K. M., Verhaag, E. M., Otis, J. P., Heldmaier, G., Swoap, S. J., Strijkstra, A. M., Henning, R. H., and Carey, H. V., 2009; Digital transcriptome analysis indicates adaptive mechanisms in the heart of a hibernating mammal; Physiological Genomics, vol. 23: pp. 227-234
- Callis, T. E., Pandya, K., Seok, H. Y., Tang, R-U., Tatsuguchi, M., Huang, Z-P, Chen, J. F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M. S., Selzman, C. H., and Wang, D-Z., 2009; MicroRNA-208 is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice; J. Clin. Invest., vol. 119:. 2772-2776
- Carey, H. V., Andrews, M. T., Martin, S. L., 2003; Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature; Physiol. Rev., vol. 83: pp.1153-1181
- Dobson, G. P., 2004; Organ arrest, protection and preservation: natural to cardiac surgery; Comparative Biochem. Physiol.; vol. 139: pp. 469-485

- Geissler, H. J., and Mehlhorn. U., 2006; Cold crystalloid cardioplegia; Manual of Cardio-Thoracic Surgery, doi:10.1510/mmcts.2004.001040
- Kübler, W., and Hass, M., 1996; Cardioprotection: definition, classification, fundamental principles; Heart, vol. 75: pp. 330-333
- Kudel, R. K., Vatner, S. F., 2003; Nitric oxide-dependent vasodilation maintains blood flow in true hibernating myocardium: J. Mol. Cell Cardiol.; vol. 35: pp. 931-936
- Li, H., Liu, T., Chen, W, Jain, M. R., Vatner, D. E., Vatner, S. F., Kudej, R. K., and Yan, L., 2013; Proteomic mechanisms of Cardioprotection during Mammalian Hibernation in Woodchucks, *Marota monax*; J. of Proteome Research, vol. 12: pp. 4221-4229
- Molkentin, J. F.; Calcineurin and Beyond: Cardiac Signaling; Circulation Research, 2000; vol. 87: pp. 731-738
- Molkentin, J. F., and Dorn II G. W.; Cytoplasmic Signaling that Regulate Cardiac Hypertrophy; Ann. Rev. Physiol. 2001; vol. 63: pp. 391-426
- Molkenting, J. D.; Calcineurin-NFAT signalimg regulates the hypertrophic response in coordination with the MAPKs; Cardiovascular Research 2004; vol. 63: pp. 467-475
- Srere, H. K.,Wang, L. C., Martin, S. I., 1992.; Central role of differential gene expression in Mammalian hibernation; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.89: pp. 7119-7123
- Wikins, B. J., and Molkentin, J. D.; Calcium-calcineurin signaling the regulation of cardiac hypertrophy; Biochem, Biophys. Res. Comm. 2004; vol. 322: pp. 1178-1181
- Yatani, A., Kim, S-J., Kudej, R. K., Wang, Q., Depre, C., Irie, K., Kranias, E. G., Vatner, S. F., Vatner, D. E., 2004; Insights into cardioprotection abtained from study of cellular Ca2+ handling in myocardium of true hibernating mammals; Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol., vol. 286: H219-228

MACROPUS EUGENII, MODELLO ANIMALE DI FISIOLOGIA DEL SALTO, DEL RICUPERO ENERGETICO ELASTICO, DI BIOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1]Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino; [2]Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Scoperta di *Macropus eugenii* e sua e biologia

Macropus eugenii è il più piccolo macropodide (dal greco μακρός - lungo, e πούς - piede), o canguro, appartenente al genere *Macropus,* della famiglia dei *Macropodidae*. E' stato il primo marsupiale ad essere avvistato nel 1628 sull'isola di West Wallaby (nel gruppo delle Houtman Abrolhos) al largo dell'attuale Geraldton (Australia Occidentale) dai sopravvissuti al naufragio del *Batavia* e al successivo massacro, e fu descritto da Francisco Pelseart, capitano del *Batavia*, nel 1629. Due secoli dopo, Anselme Gaëtan Desmarest (1817) ne fece la prima descrizione scientifica e lo chiamò *eugenii,* avendolo rinvenuto sull'Ile Eugène (ora St. Peter Island, nell'arcipelago Nuyts), così chiamata in memoria del naturalista Eugène Hamelin, comandante della nave *Naturaliste*.

La specie *Macropus eugenii* comprende tre sottospecie: *Macropus eugenii eugenii*, dell'Australia Meridionale continentale, estinto nel suo areale originario a causa del disboscamento e della predazione da parte di gatti, volpi e dinghi (*Canis lupus dingo*), e reintrodotto nel suo habitat nativo; *Macropus eugenii derbianus,* che vive nell'Australia Occidentale e in alcune isole vicine; *Macropus eugenii decres* o *Desmarest*, che è il *wallaby darma* o *dama*, diffuso nell'Isola dei Canguri, nell'Australia Meridionale. Senza entrare nei dettagli delle tre sottospecie, ci riferiremo ai canguri della specie *Macropus eugenii,* che chiameremo anche col loro nome comune: *tammar wallaby*.

Questi canguri hanno pelo prevalentemente grigio-bruno scuro sulle parti superiori del corpo, con *mèche* grigio-chiare, pelo grigio-fulvo sui fianchi e sulle zampe e grigio pallido sulle parti inferiori del corpo (fig. 1). Hanno cranio allungato e grandi orecchie appuntite. Erbivori e prevalentemente notturni, trascorrono la notte pascolando su praterie erbose mentre, nelle ore diurne, si ritirano in habitat ricchi di folti boschetti e di arbusti, chiamati *tamma* (di qui il nome comune *tammar*). *Macropus eugenii* è un animale molto sociale e gregario, le cui dimensioni sono quelle di un grosso coniglio, e presenta un marcato dimorfismo sessuale: la massa corporea varia dagli 8-9 kg dei maschi ai 5-6,5 kg scarsi delle femmine, la lunghezza del corpo va dai 59-68 cm dei maschi, ai 52-63 cm delle femmine, mentre l'altezza nei due sessi si aggira sui 45 cm e la lunghezza della coda, affusolata, è di 33-45 cm. Presenta vari importanti adattamenti fisiologici, inclusa la capacità di conservare l'energia saltando e di distinguere i colori (Lab. Animal Europe, 2014). I *tammar* non sopravvivono a temperature superiori ai 40°C e devono rifugiarsi in habitat meno caldi; per prevenire la disidratazione, urinano di meno e riassorbono l'acqua dal colon distale, producendo feci piuttosto secche. Essendo capaci di concentrare l'urina nei reni, possono sopravvivere bevendo acqua di mare.

Come la maggior parte dei macropodidi, *Macropus eugenii* segue una gerarchia sociale: i maschi, per prevalere, o ribadire la loro dominanza sui rivali e fare colpo sulle femmine, si drizzano e rimangono eretti sulle zampe posteriori, gonfiano il torace e piegano minacciosamente gli avambracci, come fanno i pugili (fig. 2). Si adattano a

Fig. 1. *Macropus eugenii* (da: zoochat.com)

vivere in cattività (fino a 12-18 anni) e sono facilmente addestrabili, le loro dimensioni permettono prelievi seriali di sangue e i piccoli sono agevolmente accessibili nel marsupio per manipolazioni sperimentali. Queste caratteristiche fanno di *Macropus eugenii* un modello animale ideale per ricerche sui marsupiali e sui mammiferi in generale: infatti, sono i marsupiali più studiati in un ampio spettro di ricerche che spaziano dalla fisiologia alla biochimica, dalla neurobiologia alla biologia della riproduzione e dello sviluppo, dalla genomica comparata all'ecologia.

Fig. 2. *Macropus eugenii* in combattimento (da: alamy stock foto)

Fisiologia del salto e del ricupero energetico elastico

Come tutti i macropodidi, *Macropus eugenii* ha zampe posteriori molto sviluppate, forti e robuste

e lunghi piedi specializzati nel salto, il suo modo principale di locomozione: si sposta saltando, con una frequenza di 3,5 salti/s e una lunghezza di 0,8-2,4 m/salto.

Nella maggior parte dei mammiferi, il consumo di ossigeno (VO2) aumenta linearmente con la velocità, ma ciò non vale per i *wallaby,* il cui VO2 si stabilizza all'aumentare della velocità. Sono state misurate le frequenze del respiro, del cuore e dei salti, il volume tidale (volume dell'aria mobilizzata/respiro), l'*output* cardiaco (gittata cardiaca) e il VO2 in *Macropus eugenii* allenati a saltare su un *tapis-roulant*. A velocità maggiori di 1,6 m/s, il tasso del consumo di energia metabolica è indipendente dalla velocità del salto. I livelli ematici di acido lattico, nel *range* di velocità in cui il VO2 è indipendente dalla velocità, aumentano mediamente di 4,8 mmol/Lt e, durante il salto bipedale, le frequenze del respiro e del movimento delle zampe rimangono tra loro nel rapporto fisso 1:1. L'inspirazione inizia quando il canguro si stacca dal suolo e questo potrebbe essere un processo passivo guidato da un pistone viscerale, cioè dallo spostamento di fegato, stomaco e pacchetto viscerale, in sinergia con le escursioni respiratorie del diaframma: un tendine, robusto e relativamente grande, presente al centro del diaframma, potrebbe essere coinvolto in questa funzione. A differenza delle frequenze respiratorie, quelle cardiache non mostrano trascinamento con il salto, mentre il sito di dissipazione della presunta escursione della pressione sanguigna nelle grandi arterie resta sconosciuto (Baudinette, 1987).

Con la stessa tecnica, sono stati misurati i tassi di VO2 e i livelli ematici di acido lattico: fino alla velocità di circa 2,0 m/s, i tassi di VO2 crescono linearmente con la velocità e non differiscono significativamente dai valori registrati in un quadrupede di pari massa corporea, mentre tra 2,0 e 9,4 m/s sono indipendenti dalla velocità del salto, e tra 3,9 e 7,9 m/s i livelli di acido lattico nel sangue sono bassi (0,83 mmol/min/kg) e non aumentano con l'aumento della velocità.

Il lavoro necessario per superare la resistenza dell'aria, misurato in un galleria del vento, aumenta esponenzialmente con la velocità, ma incrementa solo del 10% la spesa energetica della locomozione alla velocità media raggiunta. Così, durante il salto, il dispendio energetico della locomozione è effettivamente indipendente dalla velocità. Ai ritmi di andatura sul campo, il costo energetico stimato del movimento fatto saltando dai grandi canguri risulta inferiore a un terzo del valore che si registra in un quadrupede di pari massa corporea. Il risparmio energetico connesso a quest'esclusiva forma di movimento rappresenta un importante adattamento fisiologico, permettendo ai grandi macropodidi di coprire efficientemente le distanze necessarie per procurarsi il foraggio nelle lande semiaride dell'Australia (Baudinette, 1992).

I grandi mammiferi risparmiano la maggior parte dell'energia, della quale avrebbero comunque bisogno per correre, grazie a strutture elastiche presenti nelle zampe posteriori. L'energia cinetica e potenziale, persa a uno stadio della falcata, è temporaneamente immagazzinata come energia da stiramento elastico, per essere poi restituita, sotto forma di rimbalzo elastico all'inizio della falcata successiva.

Per valutare il ruolo del ricupero dell'energia elastica in *Macropus eugenii* mentre saltavano su un tapis-roulant, a velocità comprese tra 2,1 e 6,3 m/s, si sono misurate le forze in gioco nelle più importanti unità muscolo-tendinee coinvolte nell'accumulo e nel ricupero di energia elastica, usando dei trasduttori di forza applicati ai tendini dei muscoli *gastrocnemius lateralis* (GL), *plantaris* (PL) e *flexor digitorum longus* (FDL). Sono state usate registrazioni elettromiografiche dai muscoli GL e PL, effettuate simultaneamente a filmati ad alta velocità (200 fotogrammi/s) e a video (60 campi/s) per correlare l'attivazione dei muscoli e i profili cinematici delle zampe posteriori con lo sviluppo della forza muscolare. L'analisi dei risultati ottenuti con queste tecnologie integrate ha mostrato che le forze muscolari e l'immagazzinamento di energia elastica aumentano con l'aumento

della velocità nelle tre unità muscolo-tendinee studiate e che l'energia elastica, immagazzinata nella fase finale del salto, in cui i piedi tornano a contatto del suolo, dev'essere accumulata soprattutto distalmente dal ginocchio, dove i muscoli principali hanno fibre corte e la maggior parte dell'immagazzinamento di energia deve avvenire nei rispettivi tendini (Alexander, 1984).

Lo sfruttamento del rimbalzo elastico dei tendini si verifica anche in molti animali di grossa taglia, come i cavalli, tra i mammiferi, e gli struzzi e i tacchini, tra i volatili, ma in grado molto minore in termini di risparmio energetico rispetto ai canguri e, in particolare, ai *wallaby*, nel cui treno posteriore tendini e muscoli sono particolarmente sviluppati e specializzati nel salto.

Mentre la maggior parte degli animali paga un aumento del dispendio energetico all'aumentare della velocità, il *tammar wallaby* può accelerare la velocità, senza che questo comporti un maggior consumo di energia: ciò gli è possibile grazie al ricorso all'energia elastica accumulata nei grossi tendini degli arti posteriori. Durante il ciclo del salto, nella fase del distacco dal terreno, il movimento in avanti del *wallaby* rappresenta una forma di energia cinetica, mentre il contraccolpo gravitazionale sul terreno, alla fine del salto, è una forma di energia potenziale. Queste due energie si convertono nell'energia elastica da tensione in tendini che si stirano, quali il GL, il PL e l'FDL, quando il piede del canguro batte il terreno alla fine del salto, e può poi essere ricuperata nel rimbalzo elastico di questi tendini, che aiuta il *wallaby* a staccarsi dal terreno, per il balzo successivo. Fino al 90% dell'energia accumulata nell'elasticità tendinea può essere ricuperata e reimpiegata in questo modo. Più veloce salta il canguro e più pesante è il carico, maggiori sono le energie cinetica e potenziale che vengono immagazzinate e ricuperate elasticamente, cosicchè il costo energetico della locomozione può rimanere invariato a fronte di velocità o pesi oltre un normale *range* di velocità.

Riassumendo, muovendosi saltando, i canguri immagazzinano energia da tensione elastica nei tendini del treno posteriore, quando i piedi toccano il suolo, energia che viene poi ricuperata grazie al rimbalzo, nel momento in cui lasciano il terreno per il salto successivo: così possono aumentare la loro velocità saltando, senza, o con un minimo, dispendio energetico (Biewener, 1998). Perché ciò sia possibile, le fibre muscolari devono trasmettere la forza ai rispettivi tendini senza, o con minimi, cambiamenti di lunghezza, praticamente in condizioni isometriche. Per verificare questa ipotesi, si sono misurate *in vivo* le variazioni della lunghezza delle fibre muscolari di GL e PL e la forza dei rispettivi tendini, in *Micropus eugenii,* allenati a saltare a differenti velocità, su un *tapis-roulant*. I cambiamenti della lunghezza delle fibre muscolari risultano contenuti nel *range* di ±0,5 mm nel PL e di ±2,2 mm nel GL, valori che rappresentano meno del 2% e del 6%, rispettivamente, della lunghezza delle fibre muscolari a riposo del PL e del GL, probabilmente dovuti all'estensione elastica di legamenti trasversali annessi. Gran parte del cambiamento di lunghezza delle fibre del GL si registra a bassa forza, all'inizio della fase in cui la zampa è a contatto del terreno, a fronte di un comportamento generalmente isometrico a forze maggiori. Le variazioni della lunghezza delle fibre non cambiano significativamente all'aumentare della velocità di salto in ambedue i muscoli ($p>0,05$), nonostante che la forza muscolo-tendinea aumenti 1,6 volte, quando la velocità passa da 2,5 a 6,0 m/s. I cambiamenti della lunghezza delle fibre muscolari di PL e GL sono solo il 7±4% e il 34±12%, rispettivamente, dello stiramento calcolato dei rispettivi tendini, risultando in un piccolo lavoro netto per ambedue i muscoli (0,01±0,03 Joule per PL e -0,04±0,30 Joule per GL). Al contrario, l'energia elastica da tensione immagazzinata nei tendini aumenta all'aumentare della velocità, raggiungendo valori medi pari a 20 volte il lavoro di accorciamento fatto dai due muscoli.

Questi risultati mostrano che un aumento crescente di energia da tensione immagazzinata nei tendini delle zampe posteriori è utilmente ricuperato a velocità di salto costanti più elevate, senza essere dissipato da un accresciuto stiramento delle fibre muscolari e avvalorano l'ipotesi che il risparmio tendineo di energia elastica sia un importante meccanismo grazie al quale *Macropus eugenii,* e i macropodidi in generale, riescono a saltare a velocità maggiori con, o senza, un piccolo aumento della spesa di energia metabolica (Biewener, 1998).

Grazie alla capacità di accumulare energia nei tendini delle zampe posteriori, la femmina di *tammar wallaby* può portare nel marsupio un cangurino di un certo peso, senza per questo aumentare la spesa di energia metabolica (Baudinette, 1998).

Biologia della riproduzione e dello sviluppo

Macropus eugenii è un riproduttore monovulare, con poliestro stagionale discontinuo e abitudini di accoppiamento stagionali strettamente sincronizzate e promiscue, ed è dotato di un controllo lattazionale della sua riproduzione. La femmina, dopo 25-28 giorni di gestazione, partorisce un unico piccolo che allatta e trasporta nel marsupio e del quale si prende cura durante i primi 9-10 mesi di vita.

Se diventa gravida mentre ancora porta e allatta un piccolo canguro, lo sviluppo dell'embrione subisce un arresto, finchè il cangurino non lascia il marsupio: è un fenomeno adattativo chiamato "diapausa embrionale" (*delayed birth*), condizione di sospensione temporanea dello sviluppo embrionale, che si verifica grazie al blocco della proliferazione cellulare allo stadio di blastocisti. E' una strategia evoluzionistica presente anche in altri mammiferi (topo, visone, foca, capriolo, pecora e orso) che assicura la sopravvivenza dell'embrione concepito quando la madre è ancora impegnata ad allattare l'ultimo nato (Hickford, 2009).

Come in tutti i marsupiali, anche nel *Macropus eugenii* la composizione, in proteine e carboidrati, e la quantità del latte prodotto variano durante il lungo periodo della lattazione, determinando tassi di crescita e di sviluppo del cangurino lattante indipendenti dalla sua età, grazie a cambiamenti dinamici che si verificano nei geni e nelle rispettive proteine secrete dalla ghiandola mammaria (Hickford, 2009; Trott, 2003).

Bibliografia

- Alexander, R. M., 1984; Elastic energy stores in running vertebrates. Amer. Zool., 1984, vol. 24, pp. 85-94
- Baudinette, R. V., Gannon, B. J. , Runciman, W. B. , Wells., ., DO CARDIORESPIRATORY FREQUENCIES SHOW ENTRAINMENT WITH HOPPING IN THE TAMMAR WALLABY?, 1987; J. Exp. Biol., vol. 129, pp. 251-263
- Baudinette, R. V., Snyder G. K., Frappell, P, B., 1992; Energetic cost of locomotion in the tammar wallaby. Am. J. Physiol., 1992, vol. 262, R771-R778
- Baudinette, R. V. & Biewener, A. A., 1998; Young wallabies get a free ride. Nature, vol. 395, pp. 653-654
- Biewener, A. A., Konieczynski, D. D., Baudinette, R.V. (1998), *In vivo* muscle force-length behavior during steady-speed hopping in tammar wallabies. J. Exp. Biol., vol. 201: pp. 1681-1694
- Hickford, D., Emerging Model Organisms: A Laboratory Manual Vol. 2, Protocols 4 (12) 1-12 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N.Y., 2009)
- Lab. Animal Europe, 2014; The strange way of the tammar wallaby. 13, No.12, p. 39
- Trott, J. F., Biology of Reproduction, 2003, vol. 68, pp. 929-936

MACROPUS EUGENII, MODELLO ANIMALE PER STUDI DI GENOMICA COMPARATA E PER LO SVILUPPO DI NUOVI ANTIMICROBICI

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Studi di genomica comparata

Per facilitare l'interpretazione della mole di dati prodotti dal sequenziamento del genoma umano, sono stati sequenziati i genomi di varie specie di vertebrati, scelte in base alle posizioni strategiche che occupano nell'albero filogenetico, in modo da poter allineare le regioni omologhe ed identificare geni ed altri importanti segnali, attraverso la loro reciproca conservazione (*phylogenetic footprinting*). Il pannello di questi genomi abbraccia un arco di tempo di 450 milioni di anni di divergenza evoluzionistica dall'uomo. C'è, però, un *gap* temporale di molti milioni di anni, difficile da coprire, tra i mammiferi euteri (euplacentati, più evoluti) non umani, la cui divergenza filogenetica dall'*Homo sapiens* data 80 milioni di anni, e gli uccelli, la cui divergenza filogenetica dai mammiferi risale a circa 310 milioni di anni. Il topo è troppo vicino, filogeneticamente, all'uomo per garantire che le somiglianze del suo genoma con quello umano non siano altro che semplici residuati dell'evoluzione, mentre gli uccelli sono così lontani dall'uomo, che segnali possono essersi persi e può risultare difficile individuare, nei loro genomi, omologie con il genoma umano.

Marsupiali (metateri) e monotremi (prototeri: ornitorinco ed echidna) occupano una posizione importante nella filogenesi dei vertebrati, perché rappresentano, insieme agli euteri, le tre linee evolutive dei mammiferi. marsupiali e mammiferi euteri hanno condiviso, 130-148 milioni di anni fa, un comune antenato, mentre i monotremi si sono staccati da marsupiali ed euteri molto prima, circa 166 milioni di anni or sono. Come il topo, anche i marsupiali sono mammiferi, ma sono molto più lontani del topo rispetto all'*Homo sapiens*, datando la loro divergenza filogenetica dagli umani, 130 milioni di anni, contro i "soli" 65,5 milioni di anni del topo. I genomi dei marsupiali sono quindi di grande utilità nello studio della genomica comparata, collocandosi questi mammiferi metateri a un livello ideale di divergenza filogenetica dagli umani, tale da fornire una quantità di informazioni sulle variazioni delle sequenze, dell'arrangiamento e delle funzioni dei geni (Marshall Graves, 2002). Marsupiali ed euteri differiscono, tra loro, in certi meccanismi di controllo genico - come, ad esempio, l'inattivazione del cromosoma X - che sono molto conservati negli euteri.

Fig. 1. *Macropus eugenii* (da: Graeme C. Colmar)

Anche processi fisiologici come lattazio-

ne ed embriogenesi sono molto differenti in questi due gruppi di mammiferi. Importanti immuno-geni di *Macropus eugenii* (fig. 1) sono stati isolati e studiati nel 2009 e l'intero suo genoma, sequenziato nel 2011, mostra maggiori riarrangiamenti sia del genoma umano che di quello di un altro marsupiale, l'opossum brasiliano grigio dalla coda corta (*Monodelphis domestica*).

Il genoma di *Macropus eugenii*, chiamato *wallaby,* ha una dimensione maggiore di quello umano, ma è suddiviso in sole 8 coppie di grandi cromosomi, contro le 23 coppie del cariotipo umano: questa caratteristica fa di *Macropus eugenii* un modello animale di elezione per studi di genomica, riproduzione e sviluppo (Marshall Graves, 2002).

Il genoma di una femmina *wallaby* è stato sequenziato usando l'approccio W*hole-Genome Shotgun* (WGS) *DNA Sequence Assembler* e la tecnologia di sequenziamento Sanger (basata su didesossiterminatori) con una copertura 2x, potenziata con una tecnologia di nuova generazione NGS (N*ext Generation Sequencing*) e con un'ampia integrazione di mappe fisiche e di *linkage*, che hanno permesso di ricostruirne l'assemblaggio. Anche il trascrittoma di questa specie è stato sequenziato in molti tessuti e in vari momenti dello sviluppo. L'analisi di questi dati spiega alcuni processi della riproduzione, dello sviluppo e dell'evoluzione del genoma dei mammiferi: si rilevano cambiamenti nei geni della riproduzione e della lattazione, una rapida evoluzione dei geni delle cellule germinali e un'incompleta inattivazione, o silenziamento, locus-specifica del cromosoma X. Il silenziamento (perdita di funzione) di questo cromosoma è un fenomeno epigenetico che lo rende inerte dal punto di vista trascrizionale, con il risultato che, in tutte le cellule, si ha un'attenuata espressione dei geni presenti sul cromosoma stesso e dei rispettivi fenotipi. Questa inattivazione si realizza con un meccanismo di *imprinting* in tutti i tessuti delle femmine di marsupiali, ed è il cromosoma X paterno a essere silenziato (*imprinting* di origine paterna). Si osservano retrotrasposoni di nuova generazione e un complesso maggiore di istocompatibilità altamente riarrangiato, con molti geni di classe 1 situati fuori dal complesso. *[I retrotrasposoni sono frammenti di DNA, capaci di trascriversi autonomamente in un intermedio a RNA e di replicarsi in diverse posizioni all'interno del genoma]*. Infine, microRNA, scoperti di recente negli HOX *cluster* di *Macropus eugenii,* evidenziano nuovi potenziali elementi regolatori HOX nei mammiferi (Renfree, 2011). *[Gli HOX, (da homeobox) cluster, sono geni raggruppati in homeobox (HOX genes) che svolgono ruoli importanti nel percorso della formazione lungo l'asse antero-posteriore del corpo dei mammiferi; gli homeobox sono sequenze di DNA presenti nei geni coinvolti nella morfogenesi]*.

Peptidi antimicrobici nel latte di *Macropus eugenii*

Macropus eugenii non è solo un modello sperimentale utile in varie branche della ricerca biomedica, ma può anche fornire spunti originali e interessanti per il superamento di un serio problema terapeutico, che va inesorabilmente aggravandosi nella popolazione: l'antibiotico-resistenza.

Morbidità e mortalità, causate da infezioni sostenute da batteri antibiotico-resistenti, specialmente quelli del gruppo *ESKAPE* (*Entherococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e le specie del genere *Enterobacter*) sono in continuo aumento. Ogni anno, oltre 250.000 pazienti muoiono di sepsi negli USA e altrettanti in Europa. L'antibiotico-resistenza, aggravata dalla prescrizione dissennata degli antibiotici, rende particolarmente difficile la cura della sepsi e il progressivo instaurarsi della resistenza batterica desta seria preoccupazione tra gli infettivologi.

Da troppo tempo, nuovi antimicrobici entrano nel prontuario… col contagocce. Una quindicina di anni fa, una classe di antibiotici, gli oxazolidinoni, ha fatto il suo esordio in terapia,

con linezolide (antibiotico di sintesi), utilizzato principalmente per il trattamento del *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*MRSA*) e dei Gram+.

Nel 9/2003 FDA ha approvato daptomicina, antibiotico lipopeptidico attivo contro i Gram+, con meccanismo d'azione diverso da quello della maggior parte degli antibiotici. Questo farmaco interferisce su molteplici parametri vitali della biologia batterica: legandosi al batterio, provoca la depolarizzazione della membrana batterica, cui seguono la perdita del potenziale di membrana, l'inibizione della sintesi proteica, di DNA e RNA e infine la morte del batterio.

Dal 2002, la *Infectious Disease Society of America* (*IDSA*) si fa portavoce dell'inarrestabile criticità dovuta alla mancanza di nuovi antibiotici e sollecita soluzioni legislative, regolatorie e di finanziamento per neutralizzare le minacce insite in questa crisi, stimolando la ricerca e lo sviluppo di nuovi antimicrobici (Boucher, 2013). Per superare la crescente resistenza dei patogeni agli antibiotici esistenti, la *IDSA* ha fatto proprio l'allarme sulla perdurante assenza di progressi nello sviluppo di nuovi agenti terapeutici per il trattamento di infezioni refrattarie agli antibiotici, in particolare quelle sostenute dai Gram- e, lanciando la *"10 x '20 initiative"* (2010), si è fatta promotrice dell'impellente necessità di un impegno globale per trovare e sviluppare, entro il 2020, 10 nuovi antimicrobici sicuri ed efficaci, per somministrazione sistemica (Boucher, 2013).

L'oggettiva gravità e la perdurante attualità della situazione creata dall'antibiotico-resistenza è oggetto del rapporto pubblicato a fine aprile 2014, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità: *"Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014"* che parla di una nuova era "post-antibiotica" e sottolinea che: *"Questa grave minaccia è molto più di una previsione, ma è una realtà in ogni area del mondo. La questione può coinvolgere ogni persona, qualunque sia la sua età o il paese di residenza"*.

A partire dagli anni '70, il numero di nuovi antibiotici entrati in terapia è andato costantemente riducendosi. Solo di recente si sta assistendo a un'inversione di tendenza, grazie a piccole e medie imprese che hanno invertito il trend negativo con buoni risultati là dove le BigPharma si sono disinteressate. Nell'attesa che queste nuove entità molecolari entrino in terapia, la speranza è che gli anni a venire confermino la consistenza di quest'inversione di tendenza.

I nuovi antibiotici approvati negli ultimi anni si possono contare sulle dita di una mano: uno è la ceftarolina (10/2010, FDA), antibiotico di generazione avanzata, prima cefalosporina efficace anche contro *MRSA*, considerato in Italia un vero problema di salute pubblica, e contro i Gram+. Nel maggio 2014, FDA ha approvato Dalvance (dalbavancin, lipoglicopeptide antibiotico semisintetico di 2ª generazione), Sivextro (tedizolid, oxazolidinone) in giugno e Orbactiv (oritavancin, glicopeptide semisintetico) in agosto dello stesso anno. Il 19/10/2014 FDA, al termine di una procedura *fast-track*, ha approvato un quarto nuovo antibiotico: Zerbaxa (ceftolozane, e tazobactam) (CXA-201), associazione di antibiotici per la terapia di infezioni ospedaliere, sostenute da batteri Gram-. Si tratta di una nuova cefalosporina, ceftolozane, associata a tazobactam, inibitore della β-lattamasi batterica, per il trattamento di infezioni complesse del tratto urinario e intra-addominali, sostenute da *Pseudomonas aeruginosa* e altri Gram-, e della *ventilator-associated bacterial pneumonia*.

Scoprire nuovi antibiotici è una sfida che poche ditte raccolgono. La natura ha sviluppato una vasta serie di peptidi antimicrobici in microrganismi, in specie vegetali e animali: ognuna di queste ha un suo gruppo di geni correlati che mostrano le firme di differenti forze selettive. Marsupiali e monotremi devono proteggere una prole inetta, sottosviluppata e immunologicamente *naïve*, che nasce e si sviluppa al di fuori dell'ambito sterile di un utero, in ambienti con elevata carica di patogeni. Mentre il sistema immunitario adattativo della prole si sviluppa, fattori del sistema immunitario innato, prodotti dalla madre e dal figlio, devono

giocare un ruolo essenziale per proteggere il piccolo canguro, gravemente immunodeficiente. Così, l'evoluzione ha provveduto a fornire marsupiali e monotremi di sostanze secrete nel latte, dotate di attività antimicrobica, che rappresentano punti di partenza ideali per la ricerca e lo sviluppo di nuovi potenziali antimicrobici per soluzioni terapeutiche innovative. Usando sistemi computerizzati avanzati, sono stati individuati, nel latte di *Macropus eugenii*, oltre 30 possibili agenti antipatogeni, mentre nel suo genoma sono stati identificati 14 geni codificanti per le catelicidine (Fig. 2), che sono la prima linea di difesa nella protezione delle superfici interne ed esterne del piccolo ospite nel marsupio (Wang, 2011).

Un esame dei rapporti evolutivi delle catelicidine rivela che i marsupiali hanno duplicato più volte e sviluppato, a partire da un unico gene ancestrale che si è diversificato, geni che codificano per antimicrobici endogeni straordinari. Alcuni di questi geni potrebbero derivare da antichi geni persi dai mammiferi euteri nel corso dell'evoluzione (Cocks, 2009). I geni delle catelicidine sono caratterizzati da una sequenza di segnale molto conservata e da una regione pro-peptide, ma sono molto variabili nel dominio C-terminale che codifica per il peptide maturo antimicrobico, rilasciato per clivaggio a opera dell'elastasi. Le catelicidine sono polipeptidi, o piccole proteine, di 12÷100 residui amminoacidici, prodotti dai granulociti neutrofili e dai macrofagi, dalle cellule epiteliali del testicolo, dalla pelle e nei tratti gastrointestinale e respiratorio del *tammar wallaby*, a seguito di un segnale mediato da citochine pro-infiammatorie, che ne stimolano la sintesi; sono espresse, fin dall'inizio della lattazione, nella ghiandola mammaria, nelle secrezioni della cute interna del marsupio e della cute del neonato, finchè il sistema immunitario adattativo del cucciolo non si sia sviluppato completamente (Wang, 2011). Si pensa che le catelicidine agiscano in sinergia con le defensine, altri peptidi antimicrobici prodotti dagli epiteli, determinando un aumento della permeabilità della membrana esterna e interna dei microrganismi, con conseguente interruzione della sintesi di DNA e RNA e blocco della respirazione cellulare (Elsbach, 1998; Nagaoka, 2000). L'attività battericida delle catelicidine, diretta particolarmente nei confronti dei batteri Gram-, richiede un clivaggio proteolitico, che avviene durante la degranulazione nel vacuolo di fagocitosi, dove le catelicidine sono esposte all'azione delle proteasi rilasciate dai granuli azzurrofili e, in particolare, all'azione dell'elastasi. Questo frammento, liberato per clivaggio, svolge la sua attività antibatterica legandosi, col dominio cationico C-terminale, a fosfolipidi anionici di membrana (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerolo) e inserendo, nella membrana plasmatica del batterio, un dominio altamente idrofobico (Cocks, 2009; Elsbach, 1998; Nagaoka, 2000).

Nel latte di *Macropus eugenii* sono state identificate e caratterizzate tre catelicidine: AGG01, AGG02 e AGG03. Le prime due constano di 36 amminoacidi, la terza di 46; i loro residui amminoacidici, carichi positivamente, sono idrofobici e le tre catelicidine hanno una conformazione ad α-elica anfipatica[1] (Cocks, 2009). Questo antimicrobico è di vitale importanza per la sopravvivenza di *Macropus eugenii* neonato che, alla nascita, è poco più che un feto: pesa circa 440 mg, è lungo 16-17 mm, il suo stadio di sviluppo corrisponde a quello di un embrione umano di 40 giorni, è privo di polmoni formati e, per i primi 100 giorni di

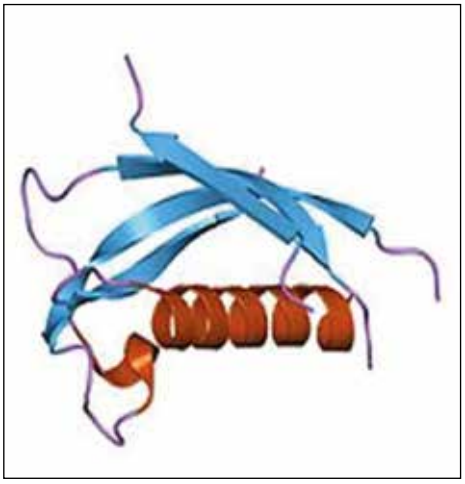


Fig. 2. Struttura della catelicidina (da: Wikipedia)

vita, anche di un sistema immunitario adattativo differenziato che, mancando di timo, milza, linfonodi e cellule T differenziate, non è in grado di produrre una specifica risposta immune (Cocks, 2009). Solo al 35° giorno di vita, compaiono le prime cellule coinvolte nell'immunità adattativa, mentre l'immunocompetenza si sviluppa soltanto 90-100 giorni dopo la nascita. Il piccolo canguro, nei primi 3-4 mesi di vita può, quindi, contare solo su alcuni agenti antimicrobici presenti nel latte materno (Fighting superbugs with milk, 2006). Tra questi, AGG01è il più studiato: è un polipeptide policationico, ricco di residui positivi di arginine e lisine, ripiegato a formare una struttura terziaria anfipatica, con domini idrofili e idrofobici. Nei test *in vitro*, AGG01 si comporta come un "antimicrobico ad ampio spettro", è 100 volte più efficace della penicillina, essendo in grado di debellare il 99% dei batteri patogeni, sia Gram- che Gram+, compresi *E. coli*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Proteus vulgaris*, *MRSA*, il fungo *Candida albicans* e ceppi vancomicina-resistenti di *Enterococcus,* particolarmente virulenti e causa di infezioni nosocomiali in pazienti ospedalizzati e tra i patogeni più temuti dai pazienti immuno-compromessi (AIDS) o immuno-soppressi (trapiantati). AGG01 è 10-15 volte più potente, *in vitro*, dell'unica catelicidina umana, LL-37, contro ceppi antibiotico resistenti di *E. coli* (2 vs 32 μg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (4 vs 64 μg/ml), *Acinetobacter baumanii* (4 vs 32 μg/ml) e *Klebsiella pneumoniae* (2 vs 32 μg/ml) (Cocks, 2009). AGG01, ora prodotta per via sintetica, esplica la sua attività battericida *in vitro* già a basse concentrazioni e dopo soli 30 minuti di incubazione con i patogeni, grazie a un originale meccanismo d'azione che colpirebbe direttamente la membrana batterica. Si pensa che, grazie alla sua struttura anfipatica, AGG01 uccida batteri Gram-, protozoi e funghi, interagendo elettrostaticamente, tramite le proprie cariche positive, con le molecole cariche negativamente (fosfolipidi anionici) costituenti le membrane cellulari dei patogeni. Inoltre, infiltrandosi nella parete del batterio, AGG01 entrerebbe in competizione con le proteine che stabiliscono legami di van der Waals e legano trasversalmente i due strati della membrana stessa. Lo scompaginamento che viene così a crearsi nella struttura della membrana batterica, causerebbe la formazione di canali transmembranali proteici, provocando la fuoruscita di ioni all'esterno della cellula batterica. L'imponente perdita di liquidi, di molecole essenziali e il calo delle concentrazioni ioniche, indispensabili allo svolgimento di molte funzioni vitali, causata dall'osmosi attraverso questi pori, sarebbe il meccanismo alla base dell'attività battericida di AGG01. Studi *in vitro* dimostrano che AGG01 non è citotossico per le cellule di mammifero, la cui membrana plasmatica differisce strutturalmente, per composizione e spessore, da quella delle cellule batteriche (Fighting superbugs with milk, Williams, 2007). Le principali differenze sono in alcuni componenti strutturali: nella membrana delle cellule di mammifero ci sono gli steroli (ad esempio il colesterolo) che danno rigidità alla parete cellulare, mentre nella membrana batterica ci sono gli opanoidi (ad esempio il diploptene), composti pentaciclici la cui funzione principale è la regolazione della fluidità della membrana plasmatica.

Nel 2007 AGG01 ha iniziato il processo di ricerca e sviluppo (R&D) non clinico (Williams, 2009) durante il quale si valutano, *in vitro* e in modelli animali, efficacia, farmacocinetica e metabolismo (ADME[2]), genotossicità, tossicità generale e della fertilità, tollerabilità e sicurezza. Questi studi sono richiesti dalle Autorità Regolatorie: *Food and Drug Administration* (FDA), ed *European Medicines Agency* (EMA) al momento della presentazione della richiesta (*Investigational New Drug* (IND) per FDA e *Clinical Trial Application* (CTA) per EMA) di autorizzazione ad accedere alla sperimentazione clinica sul volontario sano, che viene rilasciata in base ai risultati ottenuti, riportati nella relativa documentazione a supporto (*Investigator's Brochure*). Principali scopi del processo di R&D Clinico sono la valutazione della tollerabilità nei volontari sani (Fase Clinica I) e della tollerabilità, sicurezza, farmacocinetica ed efficacia nei pazienti (Fase Clinica IIa/b e Fase Clinica III). La speranza è che AGG01 entri presto nel processo di R&D clinico.

Note

Nota 1. L'alfa elica (α elica) è una struttura secondaria elicoidale delle proteine ipotizzata da Linus Pauling e Robert Corey nel 1951, e rappresenta la più semplice disposizione che una catena polipeptidica può assumere. Le α eliche si formano quando un certo numero di residui amminoacidici consecutivi adottano coppie di angoli di legame (ϕ, ψ) compresi fra -60° e -45°, che si collocano nel quadrante inferiore sinistro di un grafico di Ramachandran. Una molecola anfifilica (o anfipatica) contiene sia gruppo idrofili che idrofobi. Queste caratteristiche molecolari fan sì che se le molecole anfipatiche vengono immerse in un liquido acquoso tendono a formare spontaneamente un doppio strato, nel quale le teste idrofile sono rivolte verso l'esterno e le code idrofobe verso l'interno.
Nota 2. ADME: assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione

Bibliografia

- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Benjamin, D. K., Jr, Bradley, J., Guidos, R. J., Jones, R. N., Murray, B. E., Bonomo, R. A.,Gilbert., D., 2013; 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America Clin. Infect. Dis., 2013, vol. 56, pp. 1685-1694
- Cocks, B., *"The Future Biotechnology and Human Health"*. La Trobe University Life Sciences Computing and the Victorian Research Strategic Initiative Seminars, August 14th, 2009, Victoria, Australia
- Elsbach, P., Leukoc, J., 1998; The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense.Biol., vol. 64: pp. 14-18
- "*Fighting superbugs with milk"* in *NewScientist.com*, Magazine issue 2548, 20-4-2006
- Marshall Graves, J. A., 2002: Kangaroo genetics leaps ahead. Heredity, vol. 89, pp. 406-407
- Nagaoka, I., Hirota, S., Yomogida, S., Ohwada, A., Hirata. M., 2000; Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. Inflammation Research, 2000, vol 49, pp. 73-79
- Renfree, M. B., Papenfuss, A. T., Deakin, J. A., Lindsay, J., Heider, T., Belov, K., Rens, W., Waters, p. D., Pharo, E. A., Shaw, G., Wong E. S. W., Lefèvre, C. M., Nicholas, K. R., Kuroki, Y., Wakefield, M. J., e altri 88 autori, 2011; Genome sequence of an Australian kangaroo, *Macropus eugenii*, provides insight into the evolution of mammalian reproduction and development. Genome Biol., vol. 12: R81
- Wang, J.,Wong, E. S. W., Whitley, J. C., Li, J., Stringer, J. M., Short, K. R., Renfree, M. B., Belov, K., Cocks, B. G., Published August 30, 2011; Ancient Antimicrobial Peptides Kill Antibiotic-Resistant Pathogens: Australian Mammals Provide New Options. PLOS|ONE http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024030
- Williams, L. *"Anti-superbug weapon developed from wallaby milk"* COSMOS Magazine. 9-5-2007

CAMELUS DROMEDARIUS, MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DELL'IMMUNITÀ E DI INNOVATIVE STRATEGIE DI RICERCA, TERAPEUTICHE E DIAGNOSTICHE

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Tassonomia, biologia e habitat dei Camelidi

ll dromedario (*Camelus dromedarius*, Famiglia dei Camelidi) è un grande ungulato il cui peso corporeo grava sulle uniche due dita sviluppate (il terzo e il quarto dito) di ogni piede (di qui, il nome "Artiodattili" dato all'Ordine di appartenenza - dal greco **α**ρτιος «pari» e δ**α**κτυλος «dito» - cioè ungulati che hanno un numero pari di dita/piede). Spesse formazioni callose ricoprono le dita, permettendo al dromedario di camminare senza sprofondare nella sabbia.

Le specie viventi di cammello sono due: il dromedario, o cammello arabo, con una singola gobba (*Camelus dromedarius*, fig. 1), diffuso in Medio Oriente e nel Corno d'Africa) e il *Camelus bactrianus* (fig. 2) o cammello con due gobbe, che vive nelle steppe dell'Asia Centrale. Il manto di dromedari e cammelli può assumere le più diverse sfumature del beige, giungendo a tonalità molto scure, fin quasi al marrone-rossiccio e al nero o, al contrario, assai chiare, dal grigio al bianco.

Questi quadrupedi, non a torto chiamati "navi del deserto" ("*safinat al-barr*" in arabo) si sono adattati molto bene alle condizioni ambientali tipiche dei deserti di sabbia e di roccia, grazie anche a caratteristiche anatomiche esclusive della loro specie: hanno folte sopracciglia, due file di lunghe ciglia a protezione degli occhi, orecchie ricoperte da pelo lungo e fitto e narici molto strette, che possono essere chiuse, per proteggere le vie aeree dalla sabbia sollevata dalle tempeste del deserto (Immunity and the charismatic camel, 2013).

Il sistema immunitario dei camelidi

I camelidi sviluppano una forte resistenza a molte infezioni virali e microbiche, come il tetano, l'afta epizootica (*foot-and-mouth disease*) e l'encefalopatia spongiforme bovina (*mad cow disease*) (Jassim, 2001; Immunity and the charismatic camel, 2013).

Fig. 1. *Camelus deomedarius* (da: ojafr.ir)

Fig. 2. *Camelus bactrianus* (da: biolib.cz)

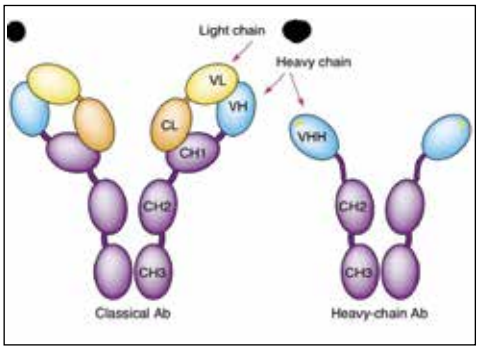


Fig. 3. da: Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol. , 74(4):277-302

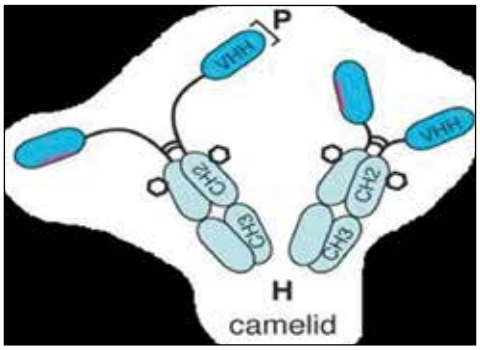


Fig. 4. da: Muyldermans S., Cambillau C., Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. Trends Biochem Sci. 2001 Apr.; 26(4):230–235

Circa venti anni fa si è scoperto che, a completamento delle loro principali tipicità fenotipiche, i dromedari e gli altri camelidi, come il lama (*Lama glama*), il *guanaco* (*Lama guanicoe*), il *vigogna* (*Vicugna vicugna*) e l'alpaca (*Vicugna pacos*), oltre alle tipologie di anticorpi convenzionali "classici" eterotetramerici, comuni a tutti i mammiferi, producono naturalmente quantità significative di anticorpi non "canonici", dotati di caratteristiche uniche (Tillib, 2011). Si tratta di anticorpi del tutto funzionali, privi di catene leggere e del dominio CH1 della catena pesante e sono composti da un omodimero di catene pesanti (*Heavy-chain antibodies*, IgG), essendo il paratope (parte dell'anticorpo che riconosce e lega l'epitopo di uno specifico antigene) costituito da un singolo dominio variabile, chiamato VHH (*llama-derived single domain nanoantibodies* (VHH nanoAbs) (figg. 3,4).

Definiti *nanobody* per le dimensioni molto ridotte (Ø 2,5 nm, altezza ~ 4 nm, massa molecolare 12-15 kDa) (Tillib, 2011) rispetto a quelle degli anticorpi classici prodotti dall'uomo e dagli altri mammiferi (massa molecolare 150-160 kDa), sommano i vantaggi degli anticorpi convenzionali a importanti caratteristiche delle piccole molecole dotate di attività farmacologiche: sono capaci, infatti, di legarsi a epitopi nascosti, inaccessibili ai classici anticorpi ingombranti stericamente (fig. 4), di massa molecolare molto maggiore, e riescono a penetrare in cellule e tessuti impermeabili a questi ultimi. Interferiscono, addirittura, con i siti di legame di alcuni enzimi, contribuendo alla proverbiale resistenza dei cammelli a molte patologie infettive. I *nanobody* sono peptidi di circa 110 amminoacidi, sono stabili e non sono tossici, assicurano un'elevata visibilità e definizione nell'*imaging* diagnostico e, grazie alle dimensioni ridotte, non sono immunogenici, o lo sono molto meno, degli anticorpi di maggior peso molecolare, caratteristiche che ottimizzano la visualizzazione delle masse tumorali cui si legano e l'impiego in terapia. Dimensioni e caratteristiche rendono i *nanobody* potenzialmente interessanti nella ricerca biomedica e biotecnologica, in particolare quella focalizzata su un ampio spettro di patologie umane comprendenti neoplasie, morbo di Alzheimer e aterosclerosi. Ad esempio, i *nanobody* di dromedario sono stati studiati contro HER2 (*Epidermal Growth Factor Receptor 2*), un marker del carcinoma mammario, per identificare le masse tumorali e migliorarne l'*imaging* molecolare (Vaneychen, 2011).

Una nuova classe di 38 *nanobody*, piccoli frammenti che legano HER2, derivati dalla

catena pesante omodimerica, è stata generata in un dromedario immunizzato. Tra questi *nanobody* è stato selezionato 2Rs15d, stabile e in grado di interagire selettivamente con HER2 ricombinante e con cellule HeLa esprimenti HER2, con affinità nanomolari (10^{-9} M) misurate alla *surface plasma resonance,* alla citometria a flusso e con studi di legame recettoriale (Vaneychen, 2011). Inoltre, aspetto rilevante in vista di eventuali impieghi terapeutico/diagnostici, 2Rs15d può essere somministrato a pazienti oncologici in terapia con anticorpi anti-HER2, trastuzumab e pertuzumab, in quanto non compete con questi. L'*imaging* quantitativa, eseguita con la *single-photon-emission computed tomography* (SPECT) e l'analisi della sua biodistribuzione, hanno mostrato che 2Rs15d, marcato con 99mTc, ha un elevato *uptake* in due modelli tumorali di HER2+, una rapida clearance ematica, un basso accumulo in organi che non sono bersagli, eccezion fatta per i reni e, un'ora dopo la somministrazione endovenosa, rapporti tumore/sangue e tumore/muscolo elevati e concomitanti (Vaneychen, 2011). Valori di *uptake* estremamente più bassi sono stati registrati per 99mTc-2Rs15d mirato a un tumore HER2-, dimostrando che il suo legame ai tumori HER2+ è selettivo.

Mentre gli anticorpi classici, a causa delle loro dimensioni, non riescono ad attraversare la barriera ematoencefalica (BBB) e non possono, quindi, raggiungere antigeni cerebrali intracellulari e a questi legarsi, i *nanobody* di cammello, grazie al ridotto peso molecolare, riescono a superarla: ciò lascia intravedere possibili impieghi dei *nanobody* nell'imaging cerebrale e nella veicolazione di farmaci idrofili (ad esempio doxorubicina e idarubicina) nel tessuto cerebrale. È stato identificato uno di questi anticorpi, naturalmente presente nell'alpaca che, in condizioni fisiologiche normali, attraversa in vivo la BBB, diffonde spontaneamente nel parenchima cerebrale e raggiunge obiettivi specifici, riconoscendo selettivamente gli astrociti (Li, 2012). Un dominio VHH ricombinante debolmente basico (punto isoelettrico pI=7,7) diretto contro un marker specifico di queste cellule della nevroglia, la proteina acida fibrillare gliale umana (GFAP), è stato in grado di attraversare spontaneamente un modello di BBB *in vitro* (Li, 2012). Solo VHH basici (pI >7), sono in grado di superare la BBB *in vitro*. VHH basici, iniettati intra-carotide ed endovena nel topo, hanno attraversato la BBB anche *in vivo* e, diffondendo nel tessuto cerebrale, sono penetrati negli astrociti, marcandone selettivamente la GFAP citoplasmatica (Li, 2012).

Per valutare la fattibilità dell'impiego dei VHH come trasportatori specifici attraverso la BBB, è stata espressa la proteina di fusione ricombinante VHH-*green fluorescent* protein (GFP). Questi *fluobodies* (*green fluorescent singlechain Fv fusion* proteins) hanno marcato in modo specifico GFAP su sezioni cerebrali di topo e una variante molto basica (pI=9,3) della proteina di fusione VHH-GFP è stata in grado di attraversare la BBB e di marcare gli astrociti *in vivo* (Li, 2012).

Il potenziale diagnostico e/o terapeutico dei domini VHH basici nel sistema nervoso centrale, confermato da questi e molti altri risultati, fa ben sperare in applicazioni medico-diagnostiche in un prossimo futuro. Infatti, *nanobody* sono da tempo in studio per valutarne l'impiego in altre tecniche diagnostiche innovative e in terapie avanzate, anche nel campo di alcune patologie neurodegenerative, quali il morbo di Alzheimer (AD), in oncologia, in particolare nelle neoplasie cerebrali e in varie patologie infiammatorie, ematologiche e polmonari.

L'accumulo e il deposito di β-amiloide (Aβ) è il principale aspetto patologico dell'AD, ma numerose evidenze sperimentali indicano in piccoli aggregati oligomerici solubili di Aβ le specie neurotossiche di questa patologia. Reagenti che riconoscono morfologie oligomeriche di Aβ hanno, quindi, un indubbio potenziale diagnostico e/o terapeutico anche nell'AD.

Usando una tecnica per selezionare ligandi anticorpali in base alla loro affinità per un

determinato target (*biopanning*), che combina la tecnologia *phage display* con la microscopia a forza atomica, è stato isolato il *nanobody* E1 contro l'Aβ oligomerica (Kasturirangan, 2012). E1 riconosce selettivamente e lega i piccoli aggregati Aβ oligomerici neurotossici solubili, e ne indirizza l'assemblaggio verso una conformazione stabile non tossica: viene così impedita la formazione di aggregati oligomerici fibrillari maggiori, che sono neurotossici, ed è eliminata qualunque forma di neurotossicità. Grazie a questa sua attività catalitica, E1 è un potenziale reagente terapeutico per l'AD e, in prospettiva, potrebbe trovare impiego clinico, eventualmente in combinazione con altri agenti terapeutici (Kasturirangan, 2012).

Il 29 ottobre 2013 è stato annunciato l'inizio della somministrazione, a volontari sani arruolati in un trial clinico di Fase 1, di un *Nanobody*® per il trattamento dell'AD. Scopo dello studio, parzialmente randomizzato e in singolo cieco, che ha arruolato 80 volontari, è valutare sicurezza, tollerabilità, farmacocinetica e farmacodinamica di dosi singole e crescenti di *Nanobody*® somministrate e.v. e s.c. (Thomson Reuters Eikon, 2013).

Applicazioni nella ricerca oncologica

Ma è soprattutto in oncologia che sono numerosi i progetti di ricerca in corso sui *nanobody* finalizzati a impieghi diagnostici e/o terapeutici. Ad esempio, sono stati sviluppati e caratterizzati *nanobody* contro il fattore di crescita epatico (αHGF) che, col suo recettore c-Met, è associato a una crescente aggressività di patologie tumorali con esito infausto nel paziente; è stata valutata la potenzialità del loro impiego in terapia e nell'*imaging* alla *positron emission tomography* (PET) per valutarne l'espressione *in vivo* (Vosjan, 2012).

Durante uno screening, sono stati identificati e caratterizzati 2 *nanobody* anti-HGF, 1E2 e 6E10, che sono stati fusi molecolarmente con un'*albumin binding nanobody unit* (Alb8), in modo da prolungarne l'emivita nel siero. La biodistribuzione dei complessi così ottenuti, radiomarcati con un emettitore di positroni, lo zirconio-89 (89Zr, t/2=78 ore), è stata studiata dopo somministrazione a topi nudi (immunodeficienti, perché privi di linfociti T funzionanti) portatori di xenotrapianti di U87 MG (*Human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line*). Inoltre, nello stesso modello animale, è stato studiato l'effetto terapeutico di 98Zr-1E2Alb8 e di 89Zr-6E10Alb8 alle dosi di 10, 30 e 100 μg/topo. I due 89Zr-nanobody hanno mostrato simile biodistribuzione e ambedue hanno bersagliato selettivamente il tumore. Il loro *uptake* nei tessuti sani è stato significativamente molto minore che nella massa tumorale, eccezion fatta per gli emuntori renali. Nella branca terapeutica dello studio, la crescita tumorale è iniziata con notevole ritardo nei topi trattati con i due *nanobody*, rispetto ai topi di controllo somministrati con sola fisiologica. Nei gruppi trattati con 100 μg/topo, 4 topi su 6 sono guariti dopo la somministrazione di 1E2-Alb8 e un *follow-up* di 73 giorni, mentre 6E10-Alb8 ha guarito 3 topi su 6.

Questi risultati confermano il potenziale terapeutico e diagnostico di 1E2-Alb8 e 6E10-Alb8 nella cura e nell'*imaging* alla PET di tumori che esprimono HGF (Vosjan, 2012).

Biodistribuzione e *uptake* nella massa tumorale sono stati studiati anche per due *nanobody* diretti al recettore dell'*Epidermal Growth Factor* (anti-EGFR), 7C12 e 7D12, marcati sulla coda di esaistidina con 99mTc-tricarbonile (99mTc-[CO]3) (Tchouate Gainkam, 2008). Questi due *nanobody* sono stati somministrati, endovena e a giorni alterni, a topi nudi con xenotrapianto di un carcinoma epidermoide sottocutaneo, A431 EGF+. Le immagini, ottenute alla *pinhole* SPECT ed elaborate con *micro-computed tomography*, sono state fuse automaticamente con l'uso di un algoritmo matematico (*mathematic rigid body transformation*) che ha fornito immagini tridimensionali per ogni singolo topo. Il legame di questi due radiotraccianti è risultato recettore-specifico e 7C12 e 7D12 sono stati captati

in modo intenso e selettivo dalle masse tumorali di A431 EGF+, mentre il loro *uptake* negli organi e tessuti sani, eccettuati i reni, è stato estremamente basso e la clearance dal sangue molto rapida. Il rapporto tumore/fondo è stato maggiore per 7C12 che, perciò, è stato selezionato per ulteriori studi, confermando che i *nanobody* sono strumenti promettenti per l'indagine *in vivo* non invasiva di target specifici, anche nell'analisi radioimmunoguidata (Tchouate Gainkam, 2008).

Interessante anche lo studio della biodistribuzione di altri due 99mTc-*nanobody* nell'*imaging in vivo* di specifici tipi cellulari del sistema immunitario, utilizzando cellule mieloidi (De Groeve, 2010). Nb-DC2.1 ha riconosciuto un ampio range di cellule mieloidi e ha bersagliato più intensamente fegato, milza e polmoni. Nb-DC1.8 ha marcato, invece, le cellule dendritiche derivate dal midollo osseo immaturo, ha emesso un segnale meno forte in fegato e milza, ma si è indirizzato preferenzialmente ai polmoni e ha dato un forte segnale nella pelle.

Per verificare se la biodistribuzione di questi due nanobody fosse regolata da uno specifico *targeting* tramite i loro *antigen-binding loop* o non fosse, piuttosto, da attribuirsi a una loro ritenzione non specifica nel parenchima degli organi sani, i loro *antigen-binding loop* sono stati geneticamente innestati sulla struttura di Nb-BCll10, un *nanobody* a basso fondo di ritenzione periferica. L'innesto degli *antigen binding loop* di Nb-DC1.8 e Nb-DC2.1 su Nb-BCll10 ha alterato la biodistribuzione di quest'ultimo, ricalcando quella dei due *nanobody* donatori degli *antigen-binding loop*, dimostrando che la distribuzione *in vivo* dei due *nanobody* riflette i principali siti dei tipi cellulari che hanno riconosciuto ed è determinata tramite i loro *antigen-binding loop* (De Groeve, 2010).

Grazie alla loro duttilità, selettività e affinità, i nanobody si sono confermati, anche in questa applicazione, un elegante strumento di indagine diagnostica *in vivo*.

L'aterosclerosi è un'altra patologia la cui diagnosi e trattamento potrebbero trarre notevole giovamento da tecniche perfezionate di *imaging*. Poter disporre di un mezzo non invasivo che permetta di rilevare e localizzare, con elevata risoluzione e precisione, placche aterosclerotiche è un'esigenza fortemente sentita non solo nella diagnostica medica avanzata, ma anche in chirurgia. Coniugando affinità nanomolari con una rapida clearance dal circolo sanguigno, i *nanobody* potrebbero trovare, in prospettiva, applicazioni anche nell'*imaging* radiodiagnostico, per individuare, localizzare e misurare placche aterosclerotiche in pazienti affetti da patologie cardiovascolari e rappresentano, perciò, una nuova e promettente classe di potenziali radiotraccianti per l'*imaging* molecolare cardiovascolare. La *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM1), è un marker infiammatorio presente nell'aterosclerosi, rappresenta un importante target per l'*imaging* molecolare delle placche aterosclerotiche (Broisat, 2012) e media l'adesione di linfociti, monociti, eosinofili e basofili all'endotelio vascolare, restringendone il lume. Oltre che nello sviluppo dell'aterosclerosi, VCAM1 può essere implicata nell'artrite reumatoide. *Nanobody* diretti selettivamente contro VCAM1, prodotti da un dromedario immunizzato, hanno permesso di identificare con precisione lesioni aterosclerotiche nel topo. In particolare, con il *nanobody* cAbVCAM1-5 anti-VCAM1 marcato con 99mTc, è stato possibile determinare *in vivo*, ma in modo non invasivo, la presenza di VCAM1 nel topo, ma anche nell'uomo, grazie alla cross-reattività topo/uomo di cAbVCAM1 (Broisat, 2012).

Da alcuni anni è stata messa a punto, in un laboratorio russo, una tecnologia molto efficiente per la produzione e lo studio di *nanobody* nel *Camelus bactrianus* (Tillib, 2011).

Curiosamente, specie filogeneticamente molto lontane dai camelidi, come gli squali e il pesce ratto (*Hydrolagus colliei*, pesce cartilagineo della classe dei Condroitti), producono anticorpi formati da due catene pesanti tenute insieme da ponti disolfuro (IgNAR, *immunoglobulin new antigen receptor*) (fig. 5). Questi anticorpi, dai quali è stata sviluppata

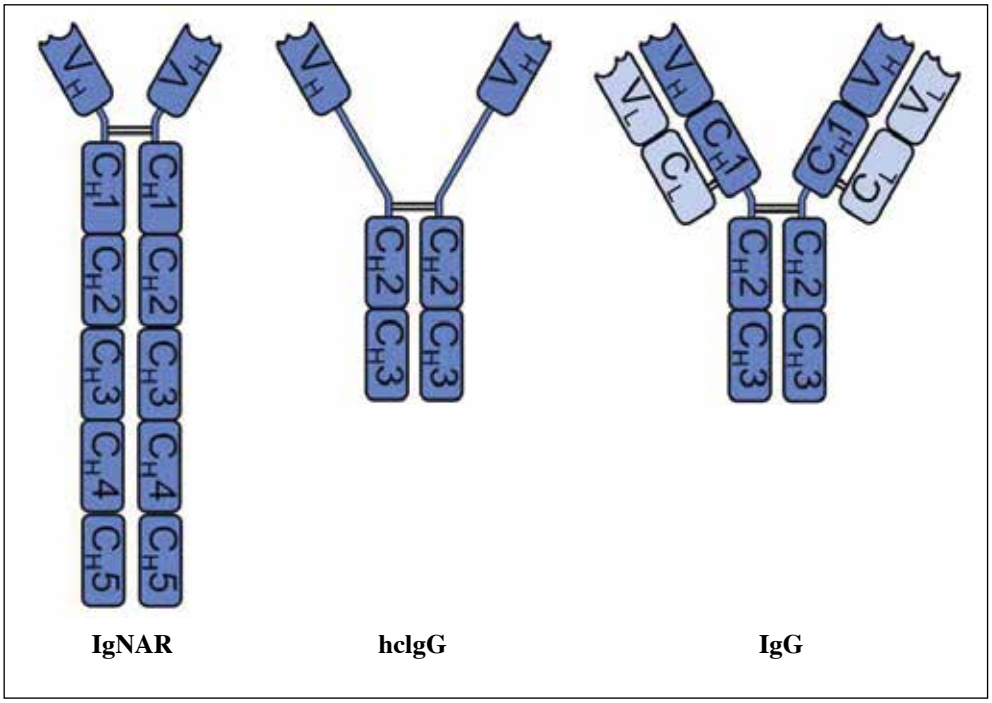


Fig. 5. IgNAR (heavy-chain shark antibody), hclgG (heavy-chain camelid antibody) e IgG (common antibody) a confronto (da: en.wikipedia.org)

una nuova classe di frammenti di anticorpi a singolo dominio (*Vnar fragments*), con uso potenziale di farmaci (*single domain antibody*), sono considerati strettamente correlati a una primordiale *antigen binding protein* (Harmsen, 2007).

Le potenzialità dei camelidi nell'offrirci mezzi diagnostici e terapeutici innovativi non si limitano ai *nanobody*. Storicamente, il latte di cammella è usato con finalità mediche nel trattamento di alcune gravi patologie. Infatti, il latte di cammella oltre a contenere *nanobody*, presenta caratteristiche interessanti ai fini di inediti sviluppi terapeutici, sia per l'attività antivirale di alcuni suoi componenti, che per il suo contenuto di fattori adiuvanti nella prevenzione e nel controllo della patologia diabetica di tipo I e II, dell'autismo, del morbo di Crohn, dell'allergia alle proteine del latte vaccino (APLV)) e nella cura della diarrea da rotavirus.

Ma questa è tutta un'altra storia…

Bibliografia

- Broisat, A., Hernot, S., Toczek, J., De Vos, J., Riou, L.M., Martin, S., Ahmadi, M., Thielens, N., Wernery, U., Caveliers, V, Muyldermans, S., Lahoutte, T., Fagret, D., Ghezzi, C., and Devoogdt, N., 2012; Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions . Circ. Res., vol. 110: pp. 927-937
- De Groeve, K., Deschacht, N., De Koninck, C.,, Caveliers, V., Lahoutte, T., Devoogdt, N., Muyldermans, .S, De Baetselier, P, and Raes G. , 2010; Nanobodies as tools for in vivo imaging of specific immune cell types. J Nucl Med. 2010;51:782–789
- Harmsen, M. M., & de Haard, H. J. W., 2007; Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 77 (No. 1): pp. 13-22
- Immunity and the charismatic camel, 2013. Laboratory Animal Europe, vol. 13, N. 7: p. 27
- Jassim, S.A.A., and Naji, M.A., 2001; The desert ship heritage and science. Biologist vol 48: pp. 268-271
- Kasturirangan, S., Li, L., Emadi, S., Boddapati, S., Schulz P., Sierks, M. R., 2012; Nanobody specific for oligomeric beta-amyloid stabilizes non-toxic form. Neurobiol. of Aging, vol. 33: pp. 1320-1328
- Li, T. JP., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A. M., Mecheri, S., Weksler, S., Romero, I., Olivier, P. O., Rougeon, F., and Lafaye, P., 2012; Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. FASEB J., vol. 26: pp. 3969-3979
- Tchouate Gainkam, L. O., Huang L., , Caveliers, V., Keyaerts, M., Hernot, S., Vaneycken, I., Vanhove, C., Revets, H., De Baetselier, P., and Tony Lahoutte,
- 2008; Comparison of the Biodistribution and Tumor Targeting of Two 99mTc-Labeled Anti-EGFR Nanobodies in Mice, Using Pinhole SPECT/Micro-CT. J. Nucl. Med. 2008; vol. 49: pp. 788-795
- Thomson Reuters Eikon: Comunicato Stampa del 29 ottobre 2013
- Tillib, S.V., 2011; "Camel nanoantibody" is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. Molecular Biology vol. 45: pp. 66-73
- Vaneycken, I., Devoogdt, N., Van Gassen, N., Vincke, C., Xavier, C., Wernery, U., Muyldermans, S., Lahoutte, T., and Cavelier, V., 2011; Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. FASEB J., vol. 25: pp. 2433-2446
- Vosjan, M.J., Vercammen, J., Kolkman, J. A., Stigter-van Walsum, M., Revets, H., van Dongen. G. A., 2012; Namobodies targeting the hepatocyre growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. Mol. Cancer Ther., vol. 11: pp. 1017-1035

CAPITOLO 2

MODELLI ANIMALI SPONTANEI DI PATOLOGIA COMPARATA

PREMESSA

Le malattie che colpiscono la popolazione umana e gli animali si presentano spesso con caratteristiche eziologiche, cliniche, morfologiche e molecolari molto simili tra di loro. Questa similarità permette di paragonare la stessa malattia tra due o più specie diverse, fornendo alla ricerca dei modelli di patologia spontanea utili per lo studio e la cura delle malattie che insorgono negli animali e nell'uomo.

I vantaggi di studiare i modelli animali spontanei sono rappresentati dal fatto che molte specie animali vivono a stretto contatto con l'uomo e sono soggette agli stessi fattori eziologici presenti nell'ambiente, distinguendoli perciò dai modelli di laboratorio, in cui la patologia viene indotta sperimentalmente.

In questa sezione verranno prese in considerazione le patologie spontanee più frequenti che insorgono negli animali in paragone all'uomo, con particolare attenzione alle malattie degenerative, metaboliche, genetiche, infettive e neoplastiche, con l'auspicio che da una maggiore conoscenza della patologia comparata possa scaturire una proficua collaborazione tra la ricerca umana e quella veterinaria.

2.1
MODELLI DI MALATTIE GENETICHE, DEGENERATIVE E METABOLICHE

LE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE IN PATOLOGIA COMPARATA

MASSIMO CASTAGNARO

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova

Introduzione

Le Malattie da Accumulo Lisosomiale (MAL) sono un numeroso gruppo di disordini genetici e acquisiti causati da alterazioni del metabolismo lisosomiale che colpiscono i mammiferi e gli uccelli (1,2). Tali alterazioni possono conseguire a mutazioni genetiche che coinvolgono direttamente gli enzimi lisosomiali o proteine a essi associate, oppure all'ingestione di sostanze in grado di interagire con la normale attività delle idrolasi acide (3). Nell'uomo sono stati identificati e caratterizzati circa 70 distinti disordini genetici, per lo più autosomici recessivi, mentre negli animali la caratterizzazione genetica della MAL riguarda poco meno di 40 malattie (2). Sebbene da un punto di vista clinico la maggior parte delle MAL si manifesti con fenotipi neurodegenerativi precoci (tipo infantile) – associati o meno ad altri reperti clinici (epatosplenomegalie, anomalie scheletriche o oculari) - sono sempre più frequentemente riportati casi più tardivi (tipo giovanile) fino a manifestazioni in età adulta (tipo adulto) (4). L'aumento dell'identificazione di casi di tipo adulto (late-onset) suggerisce che numerose forme adulte di MAL possano essere ancora non adeguatamente diagnosticate (5).

Nell'articolo vengono sinteticamente presi in considerazione gli aspetti principali delle MAL in una prospettiva comparata.

Biologia dei lisosomi

I lisosomi rappresentano la sede del catabolismo cellulare dove le macromolecole intracellulari (autofagia) ed extracellulari (endocitosi) sono degradate fornendo aminoacidi, acidi grassi liberi, acidi nucleici e monosaccaridi (1). Tale attività viene espletata attraverso un gruppo di più di 60 enzimi solubili che agiscono a pH acido: lipasi, fosfolipasi, proteasi, glicosidasi, sulfatasi e fosfatasi (6,7). I prodotti della degradazione vengono poi trasportati all'esterno dei lisosomi attraverso trasportatori specifici (8) oppure attraverso il sistema di trasporto vescicolare per il loro riutilizzo biosintetico (9). Mentre l'aumento dei flussi endocitico e autofagico stimola la degradazione lisosomiale (10), l'accumulo di cataboliti interrompe la degradazione stessa e il flusso autofagico (11). La deplezione di nutrienti inibisce la produzione di mTOR, il principale regolatore della crescita cellulare, e aumenta la formazione degli autofagosomi.

Nelle cellule in stato nutrizionale ottimale, i lisosomi presentano dimensioni (100-500 nm), numero (diverse centinaia) morfologia e distribuzione eterogenee (12). A seguito di deprivazione di nutrienti, il loro numero diminuisce drasticamente (50 per cellula), le dimensioni aumentano (500-1000nm) (11) e la loro distribuzione tende a essere perinucleare, sede dove avviene la fusione tra autofagosomi e lisosomi (13). Anche se molte sostanze contribuiscono alla distribuzione dei lisosomi, uno dei fattori meglio conosciuti per la rideterminazione del posizionamento lisosomiale è il pH intracellulare: la sua acidificazione ridistribuisce i lisosomi dalla localizzazione perinucleare alla periferia della cellula (14). Dopo

una deprivazione prolungata, il completamento dell'autofagia attiva la biogenesi dei lisosomi per ritornare alle condizioni numeriche normali (11).

Canali ionici, potenziale di membrana e trasportatori giocano un ruolo integrato essenziale nella regolazione dell'omeostasi lisosomiale mantenendo il pH acido, favorendo la fuoriuscita dei cataboliti e la fusione tra lisosomi, autofagosomi e endosomi tardivi (15).

Difetti nella degradazione, nel trasporto dei cataboliti e nelle funzioni di membrana sono responsabili di più di 50 disordini metabolici ereditari collettivamente denominati MAL.

Patogenesi

La maggior parte delle MAL sono causate da mutazioni nei geni che codificano per le idrolasi acide lisosomiali. Tuttavia, difetti nel trasposto dei cataboliti o nelle funzioni di membrana possono condurre a blocchi nei flussi funzionali e ad accumuli secondari nei lisosomi (8,16). L'accumulo primario di materiale non digerito può condurre a sua volta a un rallentamento dei processi di trasporto e delle funzioni di membrana aggravando il difetto primario (10).

La mutazione genetica alla base delle MAL può quindi determinare un'inadeguata funzione delle idrolasi acide attraverso diversi meccanismi: la mancanza della produzione dell'enzima, la produzione di un enzima cataliticamente inattivo o instabile, l'incapacità di trasportare l'enzima nei lisosomi dopo la sintesi proteica, la mancanza di proteine attivatrici (es. saposine), l'inadeguata modificazione post-traslazionale delle idrolasi acide, e l'incapacità a trasportare il prodotto di degradazione finale all'esterno dei lisosomi (p. es. acido sialico, cisteina) (2).

L'accumulo progressivo del materiale non digerito conduce alla formazione di lisosomi aumentati di volume (>1000nm) nei quali lo stesso aumento di volume è causa di un aggravamento nel rapporto tra flusso in entrata e in uscita (15). La compromissione della funzionalità globale dei lisosomi conduce poi a una deficienza di precursori per l'attività biosintetica cellulare che, a sua volta, causa un aumento dei fenomeni di autofagia compensatoria e di sintesi della proteine lisosomiali housekeeping (16).

Sebbene la tipologia e la quantità del materiale parzialmente digerito che si accumula nei lisosomi sia in funzione della specifica malattia e della funzione metabolica dei diversi tessuti (18), nella maggior parte dei casi la vulnerabilità dei neuroni, conseguenza del loro stato post-mitotico, determina un drammatico coinvolgimento del sistema nervoso centrale nelle MAL. Oltre al danno neuronale diretto provocato dalle alterazioni strutturali e funzionali lisosomiali, la morte neuronale può essere secondaria allo sviluppo dei fenomeni neuroinfiammatori riportati in diverse MAL (19). Anche se la composizione biochimica del materiale accumulato varia nelle diverse MAL, vi sono evidenze che esso possa attivare o mantenere uno stato neuroinfiammatorio (20). Alcuni Autori ipotizzano infine che le MAL e alcuni disordini neurodegenerativi si possano sviluppare attraverso vie patogenetiche comuni (21,22).

Classificazione ed aspetti clinico-diagnostici

Sulla base della caratterizzazione del gene/enzima coinvolto e della natura del substrato accumulato, le MAL vengono generalmente classificate in: Mucopolisaccaridosi (MPS) nelle quali si accumulano glicosaminoglicani (mucopolisaccaridi); Sfingolipidosi (SL) con accumulo di sfingolipidi non metabolizzati; Oligosaccaridosi e Glicoproteinosi (GL) caratterizzate dall'accumulo primario di oligosaccardi.

La manifestazione clinica di molte delle MAL varia in relazione all'attività enzimatica residua, a sua volta determinata dal tipo e dalla localizzazione della mutazione, e dalla quantità e distribuzione del materiale accumulato (23-25). Sebbene non esistano studi specifici per le MAL animali, nell'uomo l'accumulo di materiale non digerito inizia quando l'attività enzimatica residua scende sotto la soglia critica del 10-15% rispetto alla norma (23). La perdita pressoché completa dell'attività enzimatica comporta l'accumulo grave di substrato non metabolizzato e la comparsa delle devastanti forme infantili. Le mutazioni che permettono la presenza di una proteina con una residua attività enzimatica determinano invece forme cliniche più lievi e protratte denominate infantili tardive, giovanili o adulte (26). Oltre all'età di insorgenza e alla gravità dei segni clinici, in relazione alla natura dell'enzima deficiente, localizzazione e tipo di mutazione le MAL possono presentare notevoli differenze nell'interessamento nel tipo e nella gravità degli organi interessati.

Con alcune eccezioni e indipendentemente dall'età di insorgenza, il coinvolgimento del sistema nervoso rappresenta l'aspetto clinico più rilevante anche se piuttosto eterogeneo, sempre caratterizzato da deficit neurologici progressivi (2). L'interessamento del sistema nervoso può essere accompagnato da anomalie scheletriche (MPS), opacamento corneale e dismorfie faciali (GL), epato-splenomegalie progressive (SL) e cardiomegalia (glicogenosi).

Nelle forme infantili e giovanili, dove il materiale accumulato è composto anche se parzialmente da oligosaccaridi, strisci di sangue periferico possono mettere in evidenza vacuolizzazioni a carico dei linfociti o dei monociti (fig. 1). In questa tipologia di MAL, l'analisi urinaria con diversi metodi può mettere in evidenza l'eliminazione urinaria dei metaboliti interessati (GAG, oligosaccaridi). Nella maggior parte delle MAL la diagnosi di una specifica MAL può essere ottenuta dimostrando la deficiente attività enzimatica plasmatica, leucociti periferici o nei fibroblasti coltivati (2). L'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione di biopsie cutanee è uno strumento importante per l'identificazione indiretta della deficienza enzimatica e per ridurre il numero di potenziali enzimi da analizzare (vedi sezione successiva).

Anatomia patologica

Se si eccettuano le lesioni extra-neurali (organomegalie viscerali, deformazioni scheletriche), spesso il quadro macroscopico delle MAL non presenta lesioni rilevanti o significative. Gli aspetti più caratteristici, spesso diagnostici, delle MAL sono invece osservabili attraverso l'esame istologico e istochimico, e quello ultrastrutturale.

Nelle SL, l'accumulo neuronale si manifesta con distensione del corpo neuronale nel quale il citoplasma presenta piccole e diffuse vacuolizzazioni (fig.2), fortemente PAS positive nelle sezioni preparate al criostato (fig. 3). Nelle sezioni semifini colorate con Blu di Touidina i lisosomi appaiono come corpuscoli che riempiono il citoplasma del corpo neuronale (fig. 4). Ultrastrutturalmente, all'interno dei lisosomi sono osservabili i tipiche strutture lamellate parallele o concentriche (fig. 5), corpi densi o corpi tubulari contorti. Nella Malattia di Gaucher e di Krabbe la vacuolizzazione neuronale è accompagnata dalla tipica presenza di macrofagi schiumosi (fig. 6).

Nelle GL, l'interessamento neuronale è diffuso e caratterizzato dalla presenza di vacuoli vuoti o con materiale finemente fibrillare a causa dell'accumulo di sostanze più facilmente estraibili dai lisosomi durante i processi di preparazione dei tessuti.

Nelle MPS il coinvolgimento neuronale è molto diffuso ed è caratterizzato dalla presenza nei lisosomi di materiale eterogeneo (lamellare, finemente fibrillare, flocculare). Nelle MPS il coinvolgimento extraneurale (tessuti connettivi e scheletrico) è spesso massivo.

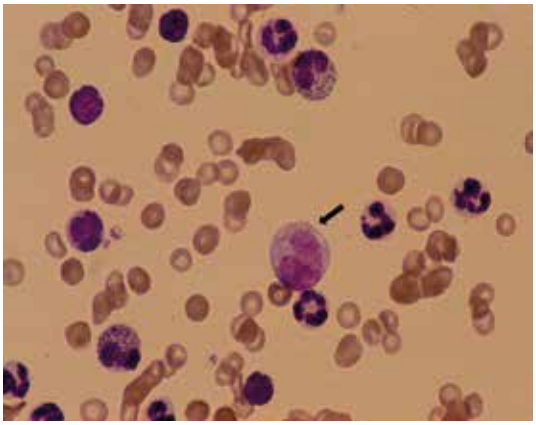


Figura 1. Gatto Korat, striscio di sangue periferico, G_{M1}-gangliosidosi: sono osservabili vacuolizzazioni multiple nel citoplasma di un monocita (freccia) (colorazione Giemsa).

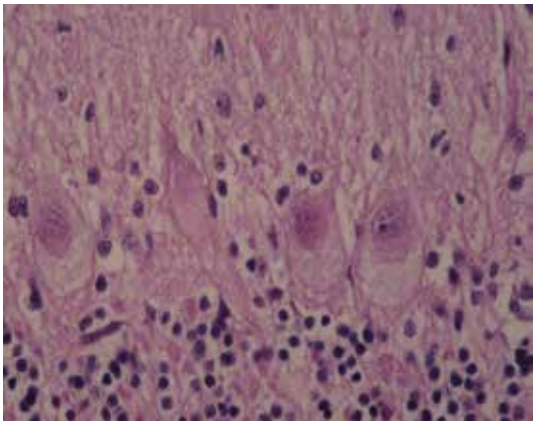


Figura 2. Gatto Korat, corteccia cerebellare, G_{M1}-gangliosidosi: il citoplasma dei neuroni di Purkinje presenta una fine vacuolizzazione eosinofila (colorazione Ematossilina-Eosina).

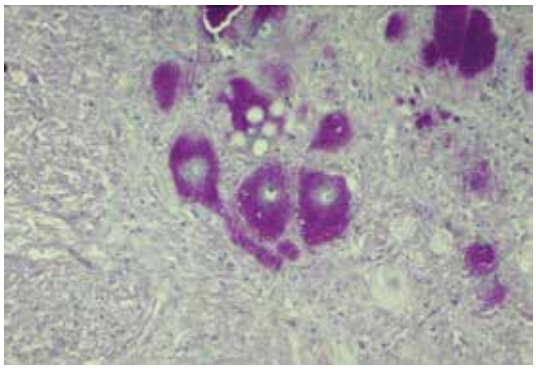


Figura 3. Gatto Korat, SNC,G_{M1}-gangliosidosi: il citoplasma dei neuroni è fortemente PAS positivo (sezione al criostato, colorazione PAS).

Le MAL come modello spontaneo in patologia comparata

In tabella 1 sono sintetizzate le MAL umane, il loro eponimo, l'enzima o la proteina di membrana interessata, il principale materiale accumulato, il tessuto/organo maggiormente coinvolto e il relativo modello animale spontaneo.

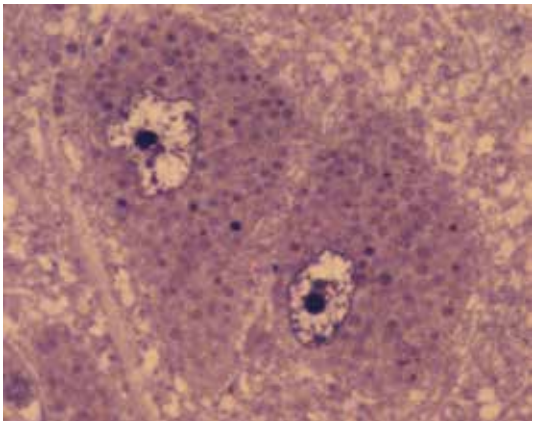


Figura 4. Gatto Korat, SNC, G_{M1}-gangliosidosi: il citoplasma dei neuroni presenta numerosissimi lisosomi ripieni di materiale non degradato (sezione semifine, colorazione Blu di Toluidina).

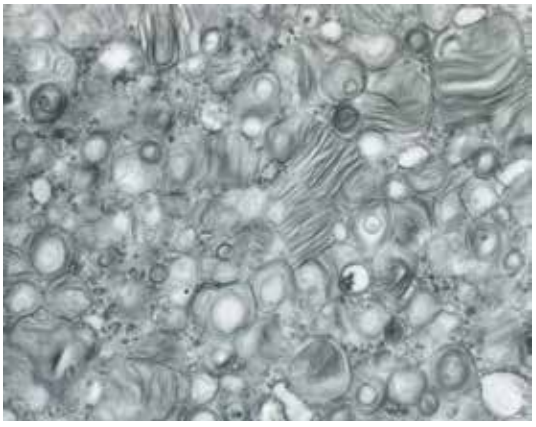


Figura 5. Gatto Korat, SNC, G_{M1}-gangliosidosi: i lisosomi sono completamente riempiti di materiale lamellare parallelo o disposto concentricamente (sezione ultrafine, TEM).

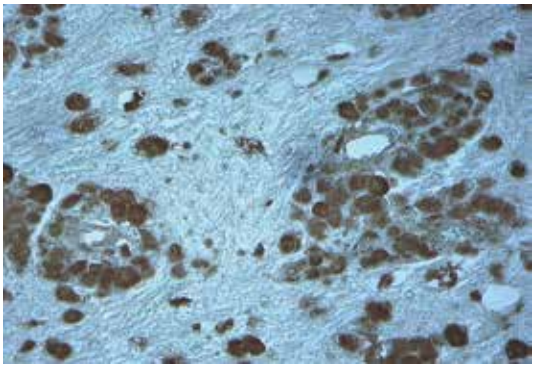


Figura 6. Cairn Terrier SNC, Malattia di Krabbe: sono identificabili due estesi manicotti perivascolari composti da macrofagi positivi per la lectina utilizzata (colorazione istochimica con lectina PNA).

La presenza di modelli animali spontanei in patologia comparata ha fornito utili conoscenze degli aspetti biochimici e patogenetici e ha contribuito al miglioramento degli approcci terapeutici.

La maggioranza delle MAL è associata a tipiche lesioni neurodegenerative per le quali

sono state esplorate diverse strategie terapeutiche al fine di superare il principale ostacolo, rappresentato dalla barriera emato-encefalica (27). Sebbene la maggior parte dei trials preclinici sia stata basata su modelli murini, alcuni modelli animali spontanei sono stati proficuamente utilizzati per lo sviluppo di terapie per la cura delle MAL (28-30). I vantaggi dell'utilizzo di modelli animali spontanei rispetto a quelli indotti come il tipo sono la durata media della vita che permette studi a lungo termine, la presenza di complessità e organizzazione del SNC più comparabile con quella umana e le dimensioni corporee che consentono prelievi di campioni e fluidi importanti (es. liquido cefalo-rachidiano) essenziali come biomarker per il monitoraggio della progressione della malattia (31).

Bibliografia

- Futerman AH van Meer G.: The cell biology of Lysosomal storage disorders. Nature Reviews – Molecular Cell Biology, 5, 554-565 2004.
- Warren C, Alroy J.: Morphological, biochemical and molecular biology approaches for the diagnosis of lysosomal storage diseases. J Vet Diagn Invest, 12, 483-496,2000.
- Warren CD et al.: Induced mannosidosis-excretion of oligosaccharides by locoweed-intoxicated sheeps. FEBS Lett 163, 99-103,1993.
- Platt FM et al.: The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. J Cell Biol, 199,723-734,2012.
- Wassif CA et al.: High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. Genet Med., 18,41-48, 2106.
- Journet A et al: Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. Proteomics, 2,1026-1040,2002.
- Eskelinen EL ed al.: At the acidic edge: emerging functions of lysosomal membrane proteins. Trends Cell Biol., 13,137-145, 2003.
- Ruivo R. e t al.: Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. Biochi, Biophys Acta, 1793, 636-649, 2013.
- Safting P. e Klumperman J.: Lysosomal biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 10,623-635,2009.
- Luzio JP et al.: Lysosomes: fusion and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 8, 622-632, 2007.
- Yu L. et al.: Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. Nature, 465, 942-946, 2010.
- Mellman I.: Organelles observed: lysosomes. Science, 244, 853-854, 1989.
- Korolchuk VI et al.: Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. Nature Cell Biol., 13, 453-462, 2011.
- Korolchuk VI e Rubinsztein DC: Regulation of autophagy by lysosomal positioning. Autophagy, 7:8, 927-928, 2011.
- Xu H. e Ren D.: Lysosomal Physiology. Annu Rev Physiol., 77, 57-80, 2105.
- Parkinson-Lawrance EJ et al.: Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. Physiology, 25, 102-115, 2010.
- Lieberman AP e t al.: Autophagy in lysosomal storage disorders. Autophagy, 8,719-730,2012.
- Castagnaro M. et al.: Lectin histochemistry and ultrastructure of feline kidneys from six different storage diseases. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 54, 16-26, 1987.
- Bosch ME e Kielian T.: Neuroinflammation paradigms in lysosomal storage diseases. Front Neurosc, 9:417,2015.
- Platt FM.: Lysosomal storage diserders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. J Biol Chem., 199,723-734,2012.
- Boland B e Platt FM: Bridging the age spectrum of neurodegenerative storage diseases. Best Practice Res Clin Endocrinol Metabolism, 29,127-143, 2015.
- Lloyd-Evans E, Haslett LJ: The lysosomal storage disease continuum with ageing-related neurodegenerative disease. Ageing Res Rev., Epub ahead of print, 2106.
- Leinekugel, P., Michel, S., Conzelmann, E. and Sandhoff, K. (1992)
- Quantitative correlation between the residual activity of β- hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. Hum. Genet. 88, 513–523, 1992.
- Neufeldt EF.: Natural history and inherited disorders of lysosomal enzyme. b-hesosaminidase. J Biol. Chem., 264, 10927-10930, 1989.

– Sandhoff K.: My journey into the world of sphingolipids and sphingolipidoses. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 88, 554–582, 2012.
– Sandhoff K.: Metabolic and cellular bases of sphingolipidoses. Biochem. Soc. Trans., 41, 1562-1568, 2013.
– Pastores GM et al: Animal models for lysosomal storage disorders. Biochemistry (Moskow), 78,721-725, 2013.
– Vuillemenot BR et al.: Mol Genet Metab.,104,325-337,2011.
– Fletcher JL e Taylor RM: Therapy development for the lysosomal storage disease Fucosidosis usign the canine animal model. Pediatr Endocrinol Rev., 13, 697-706, 2016.
– Whiting Re et al.: Intracerebroventricular gene therapy that delays neurological disease progressioni s associated with selective preservation of retinal ganglion cells in a canine model of CLN2 disease. Exp Eye Res. 146,276-282, 2016.
– Lawson CE e Martin DR.: Animal models of GM2 gangliodisosis: utility and limitations. Appl Clin Genetics, 9,111-120,2016.

SUS SCROFA COME MODELLO SPONTANEO DI GANGLIOSIDOSI GM2 DELL'UOMO

VALERIA BERTANI[1], ATTILIO CORRADI[1], GIUSEPPE MERIALDI[3], FRANCESCA RAVANETTI[2], ALESSANDRO ZOCCA[5], FABIO GUBELLINI[4], ANTONIO CACCHIOLI[2], ROSANNA DI LECCE[1], ANNA MARIA CANTONI[1]

[1] Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Unità di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Università degli Studi di Parma; [2] Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Unità di Anatomia degli Animali Domestici, Università degli Studi di Parma; [3] Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Bologna; [4] Servizio Veterinario, AUSL Imola (BO);
[5] Medico Veterinario libero professionista

Introduzione

Le sfingolipidosi sono un gruppo di patologie ereditarie causate da difetti genetici che coinvolgono enzimi attivi nella degradazione lisosomiale degli sfingolipidi. Con le mucopolisaccaridosi, le mucolipidosi, le patologie da accumulo di glicogeno e di glicoproteine, le sfingolipidosi appartengono alle patologie da accumulo lisosomiale conosciute in lingua inglese come Lisosomial Storage Disease (LSD) (1). Le idrolasi lisosomiali sono eso-enzimi che rompono legami presenti alle estremità di grandi molecole, ma incapaci di agire sui legami chimici covalenti interni: se la sequenza degradativa è bloccata in un qualsiasi punto, la digestione non può proseguire; le possibili cause che possono determinare le LSD sono:

- carenza di uno degli enzimi idrolitici contenuto nei lisosomi;
- carenza di uno dei cofattori degli enzimi idrolitici;
- carenza di una delle proteine della membrana lisosomiale (ad esempio trasportatori);
- traffico intracellulare difettoso (sistemi di trasporto coinvolti nel processo di degradazione);
- attivazione alterata di enzimi lisosomiali (2).

Ad eccezione della Malattia di Fabry (deficienza di α-galattosidasi) e della Mucopolisaccaridosi di tipo II (MPSII), (deficienza di idurosolfato solfatasi), che sono malattie recessive legate al cromosoma X, le patologie da accumulo lisosomiale sono autosomiche recessive. Negli animali domestici si osservano in allevamenti con un ridotto numero di riproduttori e sono spesso associate a consanguineità, utilizzata per fissare caratteristiche fenotipiche specifiche; questo comporta nelle razze animali una minor diversificazione genetica rispetto alla popolazione umana e la presenza di una malattia genetica riflette probabilmente una singola mutazione.

Il deficit ereditario di un enzima lisosomiale determina un incompleto catabolismo del suo substrato, con accumulo del metabolita all'interno dei lisosomi; questi, ricolmi di macromolecole parzialmente digerite, aumentano di dimensioni e interferiscono con le normali funzioni cellulari; inoltre la compromissione della funzione autofagica lisosomiale determina un "accumulo secondario" di substrati autofagici e comparsa di mitocondri degenerati; si osserva perciò l'accumulo di mitocondri disfunzionali con produzione di radicali liberi e induzione dell'apoptosi nelle cellule coinvolte nelle LSD. Il meccanismo patogenetico non è stato del tutto determinato, tuttavia è evidente che i difetti di autofagia sono comuni nelle malattie da accumulo lisosomiale e svolgono un ruolo importante nel danno tissutale (3).

Secondo la via strettamente sequenziale di degradazione degli sfingolipidi, nell'uomo sono state descritte circa 50 diverse patologie da accumulo lisosomiale (2), solitamente denominate in funzione della natura chimica del metabolita accumulato e in tempi più recenti anche in base all'enzima o cofattore mancante (1). Queste patologie mostrano un elevato

grado di variabilità fenotipica. L'esordio e lo sviluppo dei sintomi variano ampiamente tra le diverse sfingolipidosi, ma possono variare drasticamente anche nella stessa malattia; queste varianti sono sottoclassificate clinicamente con termini descrittivi come a insorgenza rapida o tardiva, di tipo I / II, di tipo A / B, o secondo il preciso difetto molecolare (4).

La patogenesi delle Sfingolipidosi dipende da diversi fattori:

– nelle Sfingolipidosi cellulo-specifiche l'accumulo si verifica soprattutto in quelle cellule e organi in cui i substrati lipidici sono prevalentemente sintetizzati o fagocitati;
– l'insorgenza e la gravità della patologia sono determinate, in parte, dall'attività residua dell'enzima nei lisosomi. Una carenza completa porta a un esordio precoce e maggiormente ingravescente della malattia. Tuttavia una piccola percentuale di attività residua dell'enzima può essere sufficiente per ritardare l'insorgenza della malattia, che si presenta con un decorso attenuato, tipico delle forme "adulte" delle malattie. Nella maggior parte delle malattie da accumulo lisosomiale, i pazienti con genotipo identico e, di conseguenza, analoga attività residua, possono avere una diversa progressione clinica, dal momento che diversi fattori genetici ed epigenetici contribuiscono all'espressione della malattia in ogni paziente.
– La conseguenza diretta del blocco metabolico è l'accumulo di substrati enzimatici corrispondenti, talvolta caratterizzati da sostanze bioattive (p.es.: una sostanza citotossica, la galactosilsfingosina detta psicosina, non sufficientemente degradata nelle cellule di pazienti affetti da malattia di Krabbe, porta alla distruzione delle cellule colpite prima che l'accumulo possa essere osservabile istologicamente).
– In seguito all'accumulo di glicolipidi, sono state osservate risposte infiammatorie con attivazione macrofagica o il rilascio di citochine, ma anche alterazione del metabolismo degli fosfolipidi, dell'omeostasi degli ioni calcio e della funzione mitocondriale (5).

Gangliosidosi

Le gangliosidosi (GM1 e GM2) sono patologie da accumulo lisosomiale causate dall'incapacità di catabolizzare i gangliosidi, che rappresentano i principali componenti della membrana plasmatica dei neuroni. Sono caratterizzate da sintomatologia neurologica che tende a comparire nelle prime fasi della vita degli organismi complessi e dall'accumulo di materiale omogeneo nel citoplasma dei neuroni del Sistema Nervoso Centrale, Periferico e Autonomo; le cellule neuronali mostrano alla microscopia elettronica a trasmissione (TEM) la presenza di lisosomi patologici definiti come "corpi citoplasmatici membranosi". Le due patologie si diversificano per il substrato patologico accumulato (GM1/GM2), l'enzima deficitario o carente (β-galattosidasi/ β- esosaminidasi) e i geni colpiti da mutazione (GLB1/HEXA-HEXB-GM2A).

Le Gangliosidosi GM1 nell'uomo

La gangliosidosi GM1 è causata dal deficit ereditario dell'enzima lisosomiale GM1-β-galattosidasi (64 kDa) che appartiene al complesso lisosomiale multienzimatico, insieme a sialidasi, catepsina A e N-acetilaminogalatto-solfatasi 6-solfato, che catalizza l'idrolisi del ganglioside GM1 a GM2 in presenza della proteina GM2 attivatore o Sap-B. (1)

Si possono distinguere nell'uomo tre forme cliniche di GM1-gangliosidosi:

- la forma infantile (tipo 1) che comporta arresto dello sviluppo corporeo e psichico, e progressivo deterioramento del sistema nervoso nella prima infanzia. I sintomi caratteristici sono risposte esagerate ai rumori, presenza di macchie a livello di retina di color rosso ciliegia, epatosplenomegalia, paralisi spastica associata a convulsioni e displasia scheletrica generalizzata; la

maggior parte dei pazienti muore entro i 2 anni di vita;
- la forma giovanile/infantile ritardata (tipo 2): è caratterizzata da sintomi neurologici progressivi nei bambini;
- la forma adulta/cronica (tipo 3): si verifica nei giovani adulti in cui spesso si evidenziano segni extrapiramidali (distonia) mentre le modificazioni dismorfiche sono meno evidenti o addirittura sono assenti.

Nella gangliosidosi GM1 si accumulano il ganglioside GM1 e altri substrati enzimatici come GA1, oligosaccaridi da glicoproteine e intermedi di degradazione del cheratan solfato. L'accumulo lisosomiale massivo di GM1 nei neuroni porta alla degenerazione del sistema nervoso; la formazione di meganeuriti e i fenomeni di dendritogenesi ectopica sono presumibilmente dovuti alla carenza del Ganglioside GM1 che ha proprietà antineurotossiche e neuroprotettive sulla membrana plasmatica. Come in altre malattie da accumulo, nella patogenesi della GM1-gangliosidosi è possibile osservare una risposta infiammatoria.

Le mutazioni genetiche identificate includono mutazioni *missense/nonsense*, duplicazioni/inserzioni e inserimenti che causano difetti di *splicing*; tuttavia non sono correlati al fenotipo dei pazienti. Attualmente non sono disponibili terapie; la terapia con *chaperone* chimici e la terapia di riduzione del materiale accumulato nel modello murino della malattia sono in fase di studio (6).

Le Gangliosidosi GM2 nell'uomo

La Gangliosidosi GM2 è causata da difetti di degradazione del ganglioside GM2, che conseguentemente viene accumulato nelle cellule neuronali. GM2 viene degradato dalla scissione del legame β-glicosidico tra il residuo N-acetilgalattosamina e il residuo galattosio dall'enzima β-esosaminidasi. Questa reazione richiede la proteina attivatore GM2 in vivo. I tre isoenzimi della β-esosaminidasi differiscono nella combinazione delle due subunità (α e β) e nella loro specificità di substrato. L'enzima β-esosaminidasi A (αβ) ha due siti attivi, uno sulla α-catena e l'altro sulla β-catena. La β-esosaminidasi B (ββ) presenta due siti attivi a livello di interfaccia dell'omodimero. La β-esosaminidasi S (αα) è di secondaria importanza per la degradazione di GM2, ma contribuisce alla degradazione dei glicosaminoglicani e dei glicolipidi solfati.

Il deficit congenito dell' attivatore GM2 e la deficienza della α o β-catena degli isoenzimi della β-esosaminidasi portano a una delle tre differenti varianti di questa patologia:
- la Variante B è causata dal deficit di α-catena con conseguente carenza di esosaminidasi A ed S, ma con normale esosaminidasi B; la sua forma infantile è solitamente chiamata Malattia di Tay-Sachs;
- la Variante 0, o malattia di Sandhoff**,** è causata da un deficit della β-catena con conseguente riduzione dell'attività di β-esosaminidasi A e B, ma con attività residua della β-esosaminidasi S;
- la Variante AB è causata da mutazioni nel gene che codifica per il GM2 attivatore, ed è caratterizzata dalle normali attività di β-esosaminidasi A, B, ed S contro il substrato naturale GM2 in saggi enzimatici contenenti detergenti.

La patogenesi della GM2-gangliosidosi non è completamente nota; anche se il prodotto accumulato (GM2) non è né tossico né immunogeno, induce risposte infiammatorie, come è stato dimostrato per i glicoconiugati nel modello murino della malattia di Sandhoff. L›induzione di misconnessioni nei dendriti neuronali e altri processi cellulari potrebbe essere una delle cause del fenotipo neurologico; inoltre il materiale di accumulo non degradato potrebbe raggiungere le membrane cellulari, come quella del Golgi e la membrana plasmatica e alterarne la composizione e la funzione. Non sono ancora disponibili terapie per rallentare lo sviluppo o controllare le manifestazioni cliniche di questa patologia, ma diverse strategie terapeutiche sono studiate in modelli di malattia (1,6).

Malattia di Tay-Sachs

Clinicamente, la B-variante della GM2-gangliosidosi può essere classificata in diverse forme: infantile, giovanile, cronica, e adulta:

- infantile: ha una prevalenza elevata tra gli ebrei Ashkenazi con una frequenza eterozigote di 1:27. I bambini affetti sono normali alla nascita e mostrano i primi sintomi, come lieve debolezza motoria e scatti improvvisi in risposta al rumore, tra i 3 e i 6 mesi di vita. Debolezza, ipotonia, riduzione dell'attenzione sono osservati insieme a sintomi visivi. Un segno clinico frequente è una macchia rossa ciliegia nella retina dei pazienti. Le abilità motorie, mentali e visive diminuiscono rapidamente dopo il 10° mese di età. Macrocefalia e convulsioni sono comuni nel secondo anno di vita. Ulteriori alterazioni portano a uno stato vegetativo. La morte spesso si verifica tra il secondo e il quarto anno di vita.
- Giovanile: i primi sintomi motori appaiono tra i 2 ei 6 anni di età, e la morte avviene tra i 10 e 15 anni. manifestazioni comuni alla fine del primo decennio: perdita della parola, spasticità, convulsioni, perdita della vista e demenza progressiva. Si giunge fino a uno stato vegetativo e i pazienti muoiono frequentemente a causa di infezioni intercorrenti.
- Cronica: l'esordio clinico è compreso tra i 2 e 5 anni di età. I sintomi comprendono anomalie nella deambulazione e nella postura. Con l'avanzare dell'età, appaiono sintomi neurologici, anche se rimangono inalterate le capacità intellettive e visive. I pazienti possono raggiungere i 40 anni d'età.
- Adulta: i sintomi sono molto eterogenei. Possono essere presenti disturbi neurologici, come l›atrofia muscolare spinale e psicosi. Tuttavia le capacità intellettive e la capacità visiva non sono alterate.

Malattia di Sandhoff

La variante 0 della Gangliosidosi GM2 è stata la prima per la quale è stato individuato il difetto enzimatico ; è caratterizzata da accumulo di glicolipidi carichi negativamente, caratteristici della malattia di Tay-Sachs, ma anche per l'aumento di glicolipidi non carichi come il glicolipide GA2 nell'encefalo e il globoside negli organi viscerali. Clinicamente, sono state individuate le seguenti forme:

- infantile: oltre alle manifestazioni cliniche e patologiche simili alla malattia di Tay-Sachs (variante B infantile), possono anche verificarsi deformazioni ossee e visceromegalia;
- giovanile: primi sintomi come afasia, atassia cerebellare, e ritardo psicomotorio appaiono tra i 3 e i 10 anni; la visione è normale, ma aumenta la spasticità, e la funzione mentale si deteriora progressivamente;
- adulta: l'insorgenza dei sintomi è ritardata all'età adulta; le manifestazioni cliniche in questa variante cronica sono simili a quelli della malattia di Tay-Sachs.

Variante A B della Gangliosidosi GM2

In questa variante, la carenza della proteina attivatrice GM2, in presenza di normali attività di β-esosaminidasi A, B, ed S, determina l'accumulo di glicolipidi GM2 e GA2. Il quadro clinico è simile a quello della malattia di Tay-Sachs con comparsa ritardata dei sintomi.

Modelli animali di Gangliosidosi

I modelli animali di Gangliosidosi sono uno strumento fondamentale per lo studio delle

patologie e sviluppo delle terapie, poiché ad oggi non sono ancora stati individuati trattamenti completamente efficaci.

Topo

Sono stati descritti diversi modelli murini di malattia di Tay-Sachs e Sandhoff. Il topo β-Gal nullo accumula il ganglioside GM1 e il suo sialoderivato, GA1 nel sistema nervoso centrale prima della comparsa dei sintomi (tremori, atassia e alterazioni dell'andatura). L'aspettativa di vita è di circa 7-10 mesi. Questo modello murino è assimilabile alla forma infantile, anche se non presenta epato-splenomegalia e displasia scheletrica; è stato utilizzato nello studio dei meccanismi patogenetici della malattia oltre che nella terapia genica e di riduzione del substrato. Un ulteriore modello murino è stato sviluppato per valutare, nella forma giovanile, la terapia chaperon.

Il modello murino di Tay-Sachs (HEXA knockout) presenta lesioni patologiche assimilabili solo in alcune aree dell'encefalo, come l'area settale, l'ippocampo e la corteccia cerebrale. La sintomatologia clinica viene indotta solamente nel topo femmina dopo 4 nidiate entro il primo anno di età.

Il modello murino di malattia di Sandhoff (HEXB knockout) presenta una grave sintomatologia neurologica, lesioni diffuse a livello encefalico e un'aspettativa di vita di circa 4 mesi.

Il modello murino di carenza del attivatore GM2 presenta un fenotipo intermedio, con lesioni a livello cerebellare e deficienze motorie ma con una normale aspettativa di vita .

La diversa gravità della patologia osservata tra i modelli animali, può essere correlata alla presenza di *pathway* alternativi per la degradazione del ganglioside GM2 nel topo. Nell'uomo, GM2 è quasi esclusivamente degradato dall'enzima Hex A; nel modello murino di Tay-Sachs, la sialidasi è in grado di convertire GM2 in GA2, il quale a sua volta è degradato attraverso l'attività minima di Hex B. La degradazione di GA2 da parte di Hex B è sostenuta da una proteina attivatrice GM2 che è molto meno restrittiva rispetto alla analoga proteina dell'uomo (7,8).

Cane

Le Gangliosidosi sono state descritte in diverse razze canine:

- la Gangliosidosi GM1 è descritta in varie razze in purezza: Beagle (9), Springer spaniel inglese (10), Cane d'acqua portoghese (modelli di forma infantile) (11); Shiba (12), Meticcio (13), Alaskan husky (modello forma giovanile) (14);
- la Gangliosidosi GM2 è descritta in altre razze in purezza: Pointer tedesco a pelo corto (15), Golden retriever (16), Barboncino nano (17), Spaniel giapponese (18) e Meticcio (19).

Gatto

La Gangliosidosi GM1 è stata descritta nel Siamese (modello di forma giovanile) (20), nel Comune europeo (modello di forma infantile) (21) e nel Korat (22).

Per quanto riguarda la Gangliosidosi GM2, nella specie felina non è mai stata descritta la malattia di Tay-Sachs. Tuttavia sono state descritte numerose mutazioni del gene felino HEXB. La sintomatologia clinica della malattia di Sandhoff, nei gatti affetti, compare a 4-7 settimane di età e comprende ipermetria, tremore della testa, convulsioni, atassia ed eventuale paresi; la morte avviene a circa 6 mesi d'età. Diverse razze sono risultate colpite da questa patologia:

- Korat (23),
- Comune europeo (24),
- Comune giapponese (25),
- Burmese (26).

Inoltre è stata individuata nel gatto Comune europeo la presenza di una mutazione della proteina attivatrice GM2 (gene GM2A); l'attività enzimatica di Hex A, B ed S non risulta alterata su substrati sintetici in presenza di detergenti (27).

Pecora

Una Gangliosidosi GM1 è stata descritta in pecore di razza Suffolk, Coopworth-Romney e Romney (modello di forma adulta/cronica) (28-30).

Nel 2010 è stata descritta la malattia di Tay-Sachs nelle pecore americane di razza Jacob; esse risultano, rispetto ad altre specie animali, modelli di ricerca appropriati per le dimensioni cerebrali notevoli, la presenta di sintomatologia conclamata e la semplicità di gestione negli stabulari. La medesima mutazione è stata descritta nelle pecore di razza Jacob inglese nel 2014 (31).

Suino

Nel 1976 fu descritto per la prima volta un episodio di Gangliosidosi GM2 in un gruppo di suini di razza Yorkshire; la sintomatologia neurologica apparve a circa 3 mesi di età con incoordinazione nei movimenti, sintomi che si sono aggravati fino alla paresi a 6 mesi. Questo caso presentava molte caratteristiche in comune con la variante AB della gangliosidosi umana: esordio tardivo e morte in età più avanzata, assenza delle lesioni retiniche, assenza di macroencefalia, insorgenza tardiva della cecità, moderato aumento del contenuto totale di gangliosidi nel cervello e deficit parziale di isoenzima A dell'esosaminidasi. Bassi livelli di attività di esosaminidasi, in particolare l'isoenzima A con un normale livello del isoenzima B, sono simili alla variante AB nell'uomo. Non fu possibile, all'epoca, determinare il difetto genetico che determinò la patologia (32,33).

Utilità e limitazione dei modelli animali

La Gangliosidosi GM2 è stata descritta in numerose specie, tuttavia solo il topo, il gatto e le pecore sono stati identificati come modelli per la ricerca.

- Topo: il *pathway* catabolico alternativo per la degradazione dei gangliosidi costituisce uno svantaggio notevole nell'uso del modello murino, rendendo difficile l'interpretazione dei risultati di alcune terapie sperimentali e di conseguenza la loro potenziale applicazione in campo umano. Inoltre l'aspettativa di vita breve nel topo preclude studi a lungo termine, e le loro dimensioni corporee talvolta limitano la possibilità di avere campioni sufficienti di tessuti e di fluidi (soprattutto CSF). I vantaggi di questo modello possono essere la necessità di poco spazio per il loro mantenimento, un ciclo vitale breve (circa 2 anni) e di gestazione (21 giorni); ciò permette di disporre di un elevato numero di animali in poco tempo e di avere spese del progetto sperimentale più contenute.
- Gatto: questo modello presenta numerose caratteristiche (fenotipiche, biochimiche e genetiche) assimilabili alla malattia di Sandhoff nell'uomo; in particolare, rispetto alla modello murino, il grado d'accumulo di GM2/GA2 è paragonabile con i pazienti umani. Le dimensioni dell'encefalo sono maggiori, con complessità e organizzazione

più simili all'uomo; ciò permette di effettuare anche tecniche di diagnostica per immagini non invasive. Inoltre è possibile effettuare campionamenti di sangue, urine e CSF per ricerca di *biomarker* utili per valutare la progressione della patologia nel tempo. La durata della gestazione nel gatto (circa 63 giorni) è più lunga di quella del topo, ma decisamente più breve rispetto a quella dell'uomo e di altri mammiferi; l'aspettativa di vita, 13-14 anni, permette di effettuare ricerche a lungo termine. La maggiore limitazione all'utilizzo del modello felino è la scarsa disponibilità di reagenti specifici per questa specie.

- Pecora: questa specie è l'unico modello di ricerca per la malattia di Tay-Sachs, con sintomi clinici misurabili; in particolar modo, le pecore rappresentano un modello per questa forma tardiva, con aspetti clinici, biochimici e patologici assimilabili. Rispetto agli altri modelli animali hanno un costo gestionale inferiore al gatto e dimensioni cerebrali maggiori; tuttavia le dimensioni corporee maggiori in proporzione all'encefalo possono determinare una valutazione errata per i dati di assorbimento intravenoso o altre terapie sistemiche. Inoltre la presenza di corna (fino a 6 nella razza Jacob) rende più difficoltose le indagini con risonanza magnetica e tomografia computerizzata; a questo, come nel gatto, si aggiunge la difficoltà di avere reagenti specie-specifici (7,8).

Il Cinghiale (*Sus scrofa*) come modello spontaneo delle Gangliosidosi dell'uomo

Il nostro studio è stato condotto su 3 cinghiali della stessa nidiata, provenienti da un allevamento semi-brado dell'appennino tosco-emiliano, che avevano manifestato gravi segni neurologici al 9° mese di età (dismetria, tremori e alterazioni comportamentali, convulsioni, atassia e decubito laterale). Dopo aver effettuato indagini virologiche e batteriologiche che hanno escluso cause infettive (Peste suina classica e Malattia di Aujeszky) e visto il peggioramento delle condizioni cliniche, i tre cinghiali sono stati sottoposti a eutanasia (Tanax®) e successivamente a esami autoptici che hanno permesso di prelevare campioni tissutali da sottoporre a indagini istopatologiche, ultrastrutturali (TEM), genetiche e biochimiche.

All'esame macroscopico sono emersi, soprattutto in uno dei tre soggetti in esame, diffusi fenomeni degenerativi a livello epatico e lieve atrofia dell'encefalo. L'esame istopatologico dell'encefalo (fig. 1,2), del midollo spinale (fig. 3), dei gangli periferici (fig. 4) e delle cellule gangliari della retina (fig. 5) ha messo in evidenza numerosi neuroni aumentati di dimensioni con citoplasma microvacuolizzato; queste vacuolizzazioni sono risultate positive al blu di Toluidina e negative alla colorazione PAS. Il nucleo dei neuroni si presentava frequentemente spostato verso la membrana cellulare e la sostanza di Nissl talvolta era assente (cromatolisi centrale); inoltre a carattere diffuso si sono osservati sferoidi e meganeuriti, con moderata presenza di fenomeni di astrogliosi. A livello epatico si evidenziava una diffusa vacuolizzazione degli epatociti e delle cellule del Kupffer (fig. 6).

L'analisi TEM ha rilevato neuroni aumentati di dimensioni e degenerati (fig. 7). Il loro citoplasma è ampliato dalla presenza di numerosi aggregati di lisosomi, circondati dalla membrana plasmatica, contenenti da moderate a elevate quantità di materiale membranoso, disposto in lamelle concentriche e spirali, con diametro 0,6-1 μm e una periodicità interlamellare di 30 nm (corpi citoplasmatici membranosi); si osservano inoltre discontinuità della membrana cellulare e un elevato numero di mitocondri caratterizzati da creste indistinte o frammentate (cristolisi). Il nucleo dei neuroni risulta spostato verso la membrana cellulare dagli accumuli lisosomiali e presenta discontinuità della membrana nucleare e dispersione della cromatina.

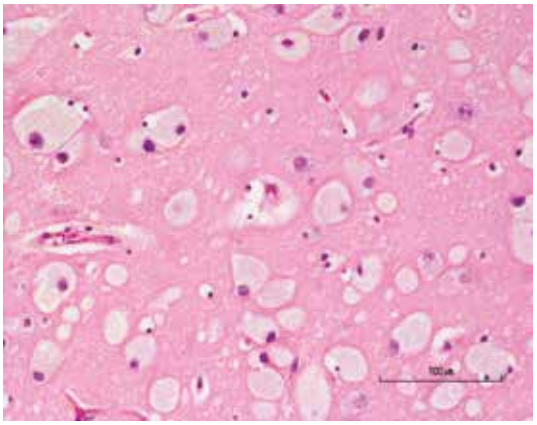


Fig. 1. Encefalo di cinghiale affetto da Gangliosidosi. I neuroni appaiono rigonfi con citoplasma finemente vacuolizzato, nucleo spostato al la periferia con talvolta assenza della sostanza di Nissl (cromatolisi centrale) (colorazione Ematosssilina-Eosina)

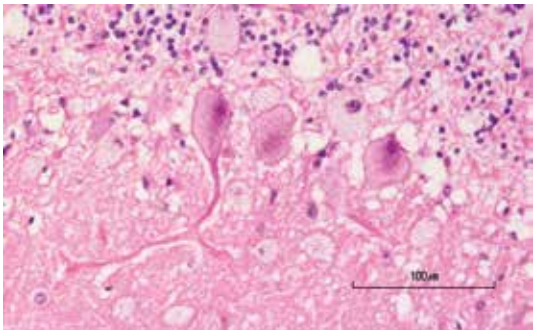


Fig. 2. Cervelletto di cinghiale affetto da Gangliosidosi. Cellule del Purkinje con vacuolizzazioni citoplasmatiche e moderato aumento delle dimensioni dei dendriti (asteroid bodies) (colorazione Ematosssilina-Eosina)

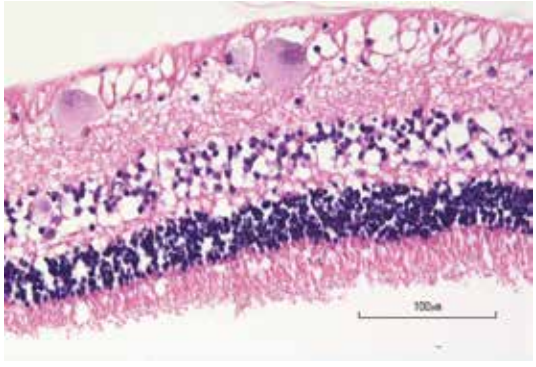


Fig. 3. Occhio di cinghiale affetto da Gangliosidosi. Le cellule gangliari della retina sono severamente aumentate di dimensioni, con citoplasma vacuolizzato e nucleo spostato dal centro del neurone verso la membrana cellulare (cromatolisi centrale) (colorazione Ematosssilina-Eosina)

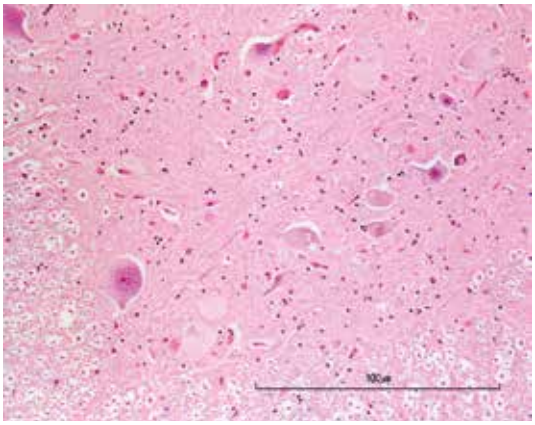


Fig. 4. Midollo spinale di cinghiale affetto da Gangliosidosi. Neuroni con citoplasma finemente vacuolizzato e aumento degli oligodendrociti (colorazione Ematosssilina-Eosina)

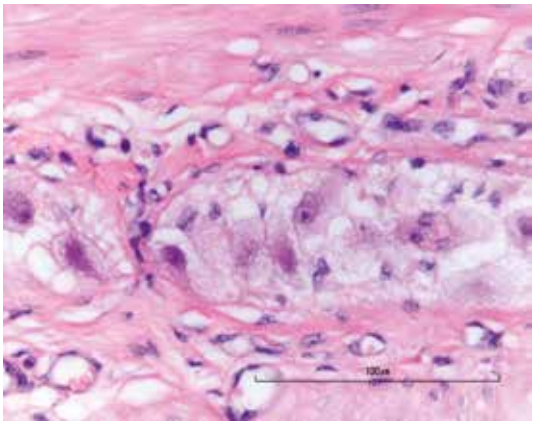


Fig. 5. Ganglio periferico di cinghiale affetto da Gangliosidosi. Si osservano neuroni aumentati di dimensioni e con diffusa vacuolizzazione del citoplasma (colorazione Ematosssilina-Eosina)

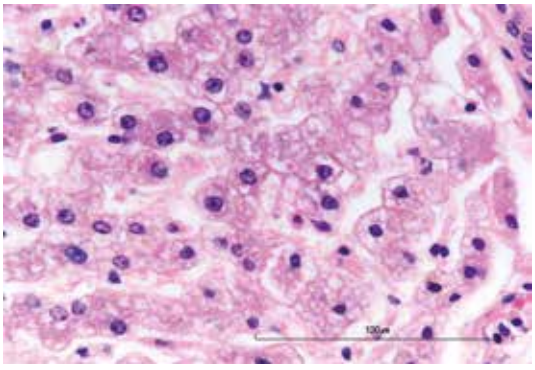


Fig. 6. Fegato di cinghiale affetto da Gangliosidosi. Diffusa vacuolizzazione intracitoplasmatica degli epatociti e delle cellule del Kupffer (colorazione Ematosssilina-Eosina)

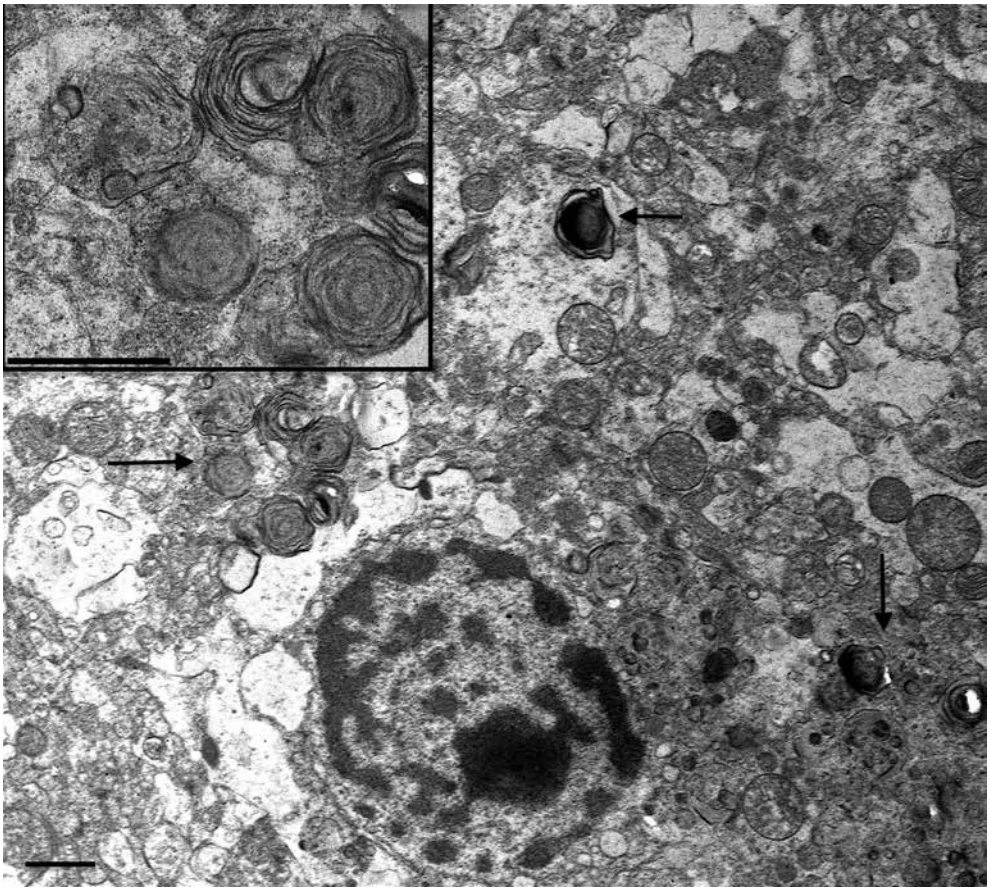


Fig. 7. Encefalo di cinghiale affetto da Gangliosidosi. Nell'immagine si osserva una porzione del corpo neuronale caratterizzato da moderato numero di corpi citoplasmatici membranosi (frecce), talvolta raggruppati o singolarmente disposti, e numerosi mitocondri degenerati. Nel riquadro si osservano diversi corpi citoplasmatici membranosi a maggior ingrandimento (Microscopia elettronica a trasmissione; barra=1 μm).

Conclusioni

I seguenti rilievi clinici, istopatologici e ultrastrutturali ci hanno permesso di emettere una diagnosi di malattia da accumulo lisosomiale su base genetica e in particolare di una Gangliosidosi, caratterizzata da:

- sintomatologia neurologica, con comparsa dei segni nei primi mesi di vita e con rapido aggravarsi delle condizioni cliniche in animali della stessa nidiata, in assenza di agenti patogeni;
- fenomeni lesivi che interessano prevalentemente i neuroni del sistema nervoso centrale, periferico e autonomo (vacuolizzazioni, sferoidi, meganeuriti (3) e astrogliosi) (34);
- presenza, all'esame ultrastrutturale dei neuroni, di corpi citoplasmatici membranosi, pa-

tognomonici della patologia (35) con accumulo di mitocondri degenerati e alterazione delle membrane cellulari e nucleari.

Nel cinghiale, a eccezione di un singolo caso riportato nel 1976 nella specie suina da Pierce (32), non sono mai stati descritti casi di patologie da accumulo lisosomiale. Poiché tutti i soggetti della nidiata sono risultati affetti dalla patologia, si ritiene che siano omozigoti e i genitori *carrier* eterozigoti, di una mutazione che determina alterazione della struttura di uno dei due possibili enzimi coinvolti (β-galattosidasi o β- esosaminidasi) con conseguente riduzione dell'attività enzimatica e accumulo di materiale all'interno dei lisosomi.

Riteniamo che questi animali possano essere un buon modello animale della patologia umana per diversi motivi:

- numerose caratteristiche (sintomatologia, età di insorgenza, lesioni viscerali) accomunano la patologia nel cinghiale e nel uomo;
- il cinghiale è una specie con elevata capacità riproduttiva, e si potrebbe ottenere un elevato numero di animali malati in poco tempo;
- nel cinghiale la malattia è spontanea, indotta da una mutazione casuale nella popolazione e questo lo rende un modello più simile a quello umano.

Sono in corso ulteriori indagini biochimiche e genetiche per definire correttamente se si tratti di GM1 Gangliosidosi o GM2 Gangliosidosi.

Bibliografia

1. T. Kolter e K. Sandhoff, «Sphingolipid metabolism diseases,» Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1758, p. 2057–2079, 2006.
2. S. Santra e U. Ramaswami, «Lysosomal disorders,» Paediatrics and Child Health, vol. 25, n. 3, pp. 123-132, march 2015.
3. V. Kumar, A. Abbas e J. Aster, Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 9 a cura di, Elsevier Health Sciences, 2014.
4. R. Jolly, «Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology,» Veterinary pathology, vol. 34, pp. 527-548, 1997.
5. T. Kolter, «A view on sphingolipids and disease,» Chemistry and Physics of Lipids, vol. 164, p. 590–606, 2011.
6. D. Regier, R. Proia, A. D'Azzo e C. Tifft, «The GM1 and GM2 Gangliosidoses: Natural History and Progress toward Therapy,» Pediatr Endocrinol Rev, vol. suppl 1, pp. 663-673, 2016.
7. H. Zigdon, A. Meshcheriakova e A. Futerman, «From sheep to mice to cells: Tools for the study of the sphingolipidoses,» Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1841, pp. 1189-1199, 2014.
8. C. Lawson e D. Martin, «Animal models of GM2 gangliosidosis: utility and limitation,» The Application of Clinical Genetics, vol. 6, n. 9, pp. 111-120, 2016.
9. D. Read e D. Harrington, «Neuronal-visceral GM1 gangliosidosis in a dog with beta-galactosidase deficiency,» Science, vol. 194, pp. 442-5, 1976.
10. J. Alroy e U. Orgad, «Neurovisceral and skeletal GM1-gangliosidosis in dogs with beta-galactosidase deficiency,» Science, vol. 229, pp. 470-472, 1985.
11. G. Saunders e P. Wood, «GM1 gangliosidosis in Portuguese water dogs: pathologic and biochemical findings.,» Vet Pathol, vol. 25, pp. 265-9, 1988.
12. O. Yamato e K. Ochiai, «GM1 gangliosidosis in shiba dogs,» Vet Rec, vol. 146, pp. 493-496, 2000.
13. P. Whitfield e A. Johnson, «GM1-gangliosidosis in a cross-bred dog confirmed by detection of GM1-ganglioside using electrospray ionisation-tandem mass spectrometry,» Acta Neuropathologica, vol. 100, pp. 409-414, 2000.
14. G. Müller e S. Alldinger, «GM1-gangliosidosis in Alaskan huskies: clinical and pathologic findings.,» Vet Pathol, vol. 38, pp. 281-90, 2001.
15. B. Volk, E. Karbe e B. Schiefer, «Familiar amaurotic idiocy in male German shorthair pointers,» Vet Pathol, vol. 4, p. 267, 1967.
16. O. Yamato e N. Matsuki, «Sandhoff disease in a golden retriever dog.,» J Inherit Metab Dis, vol. 25, pp. 319-20, 2002.
17. S. Tamura e Y. Tamura, «GM2 Gangliosidosis Variant 0 (Sandhoff-Like Disease) in a Family of Toy Poodles,» J Vet Intern Med, vol. 24, pp. 1013-1019, 2010.
18. Freeman e S. Platt, «GM2 Gangliosidosis (B Variant) in Two Japanese Chins: Clinical, Magnetic Resonance Imaging and Pathological Characteristics,» J Vet Intern Med, vol. 27, p. 771–776, 2013.
19. M. Kohyama, A. Yabuki e Y. Kawasaki, «GM2 Gangliosidosis Variant 0 (Sandhoff Disease) in a Mixed-Breed Dog,» Journal of the American Animal Hospital Association, vol. 52, n. 6, pp. 396-400, 2015.
20. H. Baker e J. Lindsey, «Neuronal GM1 gangliosidosis in a Siamese cat with beta-galactosidase deficiency.,» Science, vol. 174, pp. 838-839, 1971.
21. H. Baker e J. Lindsey, «Animal model: feline GM1 gangliosidosis,» Am J Pathol, vol. 74, p. 649–652, 1974.
22. R. De Maria e S. Divari, «Beta-galactosidase deficiency in a Korat cat: a new form of feline

GM1-gangliosidosis,» Acta Neuropathol, vol. 96, n. 3, pp. 307-314, 1998.
23. E. Neuwelt e W. Johnson, «Characterization of a new model of GM2-gangliosidosis (Sandhoff's disease) in Korat cats,» J Clin Invest, vol. 76, n. 2, pp. 482-490, 1985.
24. L. Cork e J. Munnell, «GM2 ganglioside lysosomal storage disease in cats with beta-hexosaminidase deficiency.,» Science, vol. 196, n. 4293, pp. 1014-1017, 1977.
25. O. Yamato e S. Matsunaga, «GM2-gangliosidosis variant 0 (Sandhoff-like disease) in a family of Japanese domestic cats,» Vet Rec, vol. 155, n. 23, pp. 739-744, 2004.
26. Bradbury e N. Morrison, «Neurodegenerative lysosomal storage disease in European Burmese cats with hexosaminidase beta-subunit deficiency.,» Mol Genet Metab, vol. 97, n. 1, pp. 53-59, 2009.
27. D. Martin e N. Cox, «Mutation of the GM2 activator protein in a feline model of GM2 gangliosidosis.,» Acta Neuropathol, vol. 110, n. 5, pp. 443-450, 2005.
28. B. Skelly, M. Jeffrey, F. RJ e B. Winchester, «A new form of ovine GM1-gangliosidosis.,» Acta Neuropathol, vol. 89, n. 4, pp. 374-379, 1995.
29. Ahern-Rindell e P. D., «Inherited lysosomal storage disease associated with deficiencies of β-galactosidase and α-neuraminidase in sheep,» American Journal of Medical Genetics, vol. 39, n. 1, pp. 39-56, 1988.
30. S. Ryder e M. Simmons, «A lysosomal storage disease of Romney sheep that resembles human type 3 GM1 gangliosidosis.,» Acta Neuropathol, vol. 101, n. 3, pp. 225-228, 2001.
31. M. E. Wessels e J. P. Holmes, «GM2 Gangliosidosis in British Jacob Sheep,» J. Comp. Path., vol. 150, pp. 253-257, 2014.
32. K. Pierce, S. Kosanke, W. Bay e C. Bridges, «Animal model of human disease: GM2 gangliosidosis,» The American Journal of Pathology, vol. 83, n. 2, pp. 419-422, 1976.
33. S. Kosanke, K. Pierce e W. Bay, «Clinical and biochemical abnormalities in porcine GM2-gangliosidosis,» Vet Pathol, vol. 15, n. 6, pp. 685-699, 1978.
34. K. V. Rama Rao e T. Kielian, «Astrocytes and Lysosomal Storage Diseases,» Neuroscience, vol. 323, pp. 195-206, 2016.
35. E. Parkinson-Lawrence, T. Shandala e M. Prodoehl, «Lysosomal Storage Disease: Revealing Lysosomal Function and Physiology,» Physiology, vol. 25, pp. 102-115, 2010.
36. G. Maxie, Jubb, Kennedy & Palmer›s Pathology of Domestic Animals, 6 a cura di, Elsevier Health Sciences, 2015.

MALFORMAZIONI ANIMALI E LORO IMPORTANZA IN PATOLOGIA COMPARATA

GIUSEPPE MAZZULLO, BATTESIMO MACRÌ

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina

Le malformazioni rappresentano l'esito di processi teratogeni che avvengono durante la vita intrauterina e che fanno parte dei cosiddetti difetti congeniti (1), caratterizzati dallo "sviluppo anormale, insufficiente o nullo del feto o di una delle sue parti" (2,3).

Se tali anomalie si dovessero manifestare con un grado molto elevato, assumono la definizione di mostruosità fetali (1,2), di cui esistono numerose classificazioni sia in patologia umana sia veterinaria.

Gli aspetti lesivi possono assumere carattere macroscopico, microscopico o entrambi; per tale motivo possono essere riconosciute alla nascita o individuate anche in seguito (4), risultando eventualmente causa di distocia o nascita di feti morti o di feti poco vitali o con alterazione dello sviluppo; altre invece, non sono rilevabili senza un attento esame clinico-patologico o un esame post-mortem (5,6).

In generale, le anomalie congenite vengono classificate in:

- agenesia o aplasia (assenza di uno o più organi);
- ipoplasia (minore sviluppo);
- disgenesia (difettosa evoluzione o regressione organica);
- displasia (alterazione qualitativa degli elementi morfologici che costituiscono la struttura dell'organo);
- iperplasia (aumento di dimensioni di un organo);
- ectopie (alterazioni di posizione) (7).

Queste anomalie possono colpire una singola struttura o funzione, oppure coinvolgere vari sistemi dell'organismo o ancora unire difetti strutturali e funzionali, producendo una vera e propria sindrome.

Nell'ambito delle malformazioni congenite è possibile definire una classificazione secondo la genesi formale che le suddivide in malformazioni per difetto e malformazioni per eccesso; al primo gruppo vi appartengono quelle determinate da uno sviluppo incompleto dell'organo; al secondo, invece, quelle conseguenti a un accrescimento eccessivo a carico di un organo o dell'intero organismo, e tra esse le malformazioni doppie o mostruosità doppie (8).

Fig. 1. Thoracopagus. Vitelli (Mazzullo G. et al.: Mostruosità doppia in un bovino. Contributo casistico. Rivista di Parassitologia, XIII (LVII), suppl. n. 3, 199, 1996).

I mostri doppi o duplicità congiunte, sulla base di un concetto esclusivamente morfologico, sono costituiti generalmente dall'unione di due organismi, più o meno normalmente conformati, oppure da un

Fig. 2. Monocephalus dipygus (parapagia cefalica). Cucciolo di cane (Mazzullo G. et al.: Incomplete caudal duplication in a puppy: gross and radiological observations. Journal of Small Animal Practice, 48(7):410-3, 2007).

Fig. 3. Acardius acephalus. Capretto (Macrì F et al.: Acardius acephalus in a goat kid – radiological and gross findings: a case report. Veterinarni Medicina, 58(11):591–593, 2013).

solo corpo almeno in parte raddoppiato. Secondo Schwalbe (9), pur basandosi sullo stesso concetto morfologico, le mostruosità doppie sono caratterizzate da una duplicazione almeno parziale dell'asse corporeo e risultano da una divisione incompleta del disco embrionale (10-12).

Le duplicazioni embrionali e i mostri doppi comprendono una serie progressiva di malformazioni che può variare dalla duplicazione parziale di una parte del corpo fino a quella

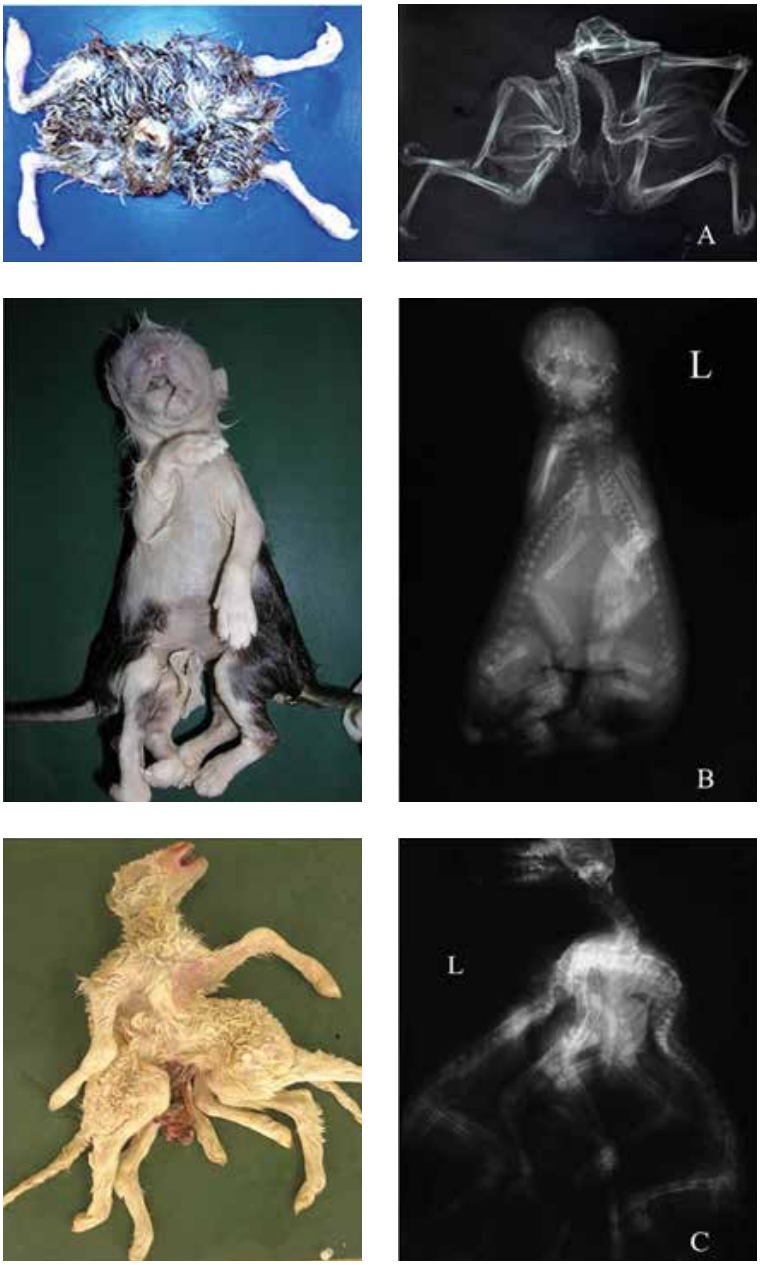


Fig. 4. A: Cephalopagus. Pulcini di struzzo (Mazzullo et al.: A case of conjoined cephalopagus twinning in an ostrich (*Struthio camelus*)., Anat. Histol. Embryol., 36(4):263-5, 2007). B: Cephalothoracopagus. Gattini (Mazzullo et al.: Deradelphous Cephalothoracopagus in Kittens., Anat. Histol. Embryol., 38:327-329). C: Cephalothoracopagus. Agnelli (Lanteri et al.: A rare case of Deradelphus Cephalo-Thoracoomphalopagus in lamb. Anat. Histol. Embryol., 42:394–397, 2013).

quasi completa di due individui, derivando, in genere, da un singolo uovo e sono dello stesso sesso. Essi rappresentano una aberrazione del "normale" processo di duplicazione che porta alla formazione di due gemelli identici o monozigoti separati tra loro. Il meccanismo di formazione dei mostri doppi è probabilmente spiegato in maniera migliore dalla teoria formulata da Zimmermann (13), secondo la quale la scissione della massa embrionale primitiva si verificherebbe all'uno o all'altro polo dell'asse sagittale o in un punto tra di essi prima della differenziazione del disco embrionale.

Il periodo dell'anormale o incompleta suddivisione dell'area assiale del disco embrionale si verifica all'ultimo stadio di blastocisti, con embrioni muniti di una placenta, una cavità amniotica e un corion in comune.

Vari termini descrittivi sono stati utilizzati per la classificazione di queste mostruosità, in base alle parti o regioni interessate dalla duplicazione e/o dalla fusione e secondo certi piani geometrici (9,14-17).

La classificazione proposta da Duhamel (15) sembra essere la più semplice e fonte di minore confusione e ordina le duplicazioni in:

– duplicità disgiunte,
– duplicità unite.

Baldwin (18) e Jeanty (19) propongono una classificazione basandosi soprattutto sulla simmetria o asimmetria delle stesse.

Le duplicità unite simmetriche vengono suddivise in base a ipotetici piani geometrici secondo i quali avviene la fusione dei due assi embrionali; questa unione può avvenire:

– fianco a fianco, su uno stesso piano orizzontale (Parapagia) e/o secondo angoli a diversa inclinazione;
– estremità contro estremità, sempre su uno stesso piano orizzontale (i due embrioni saranno opposti per le due estremità craniali o caudali - Crucipagia);
– faccia a faccia, su uno stesso piano sagittale.

Queste mostruosità sono provviste di un solo cordone ombelicale (Mononfali). Esistono tuttavia dei mostri doppi in cui ciascuno degli elementi costituenti presenta un proprio cordone ombelicale (Eusonfali); quest'ultima categoria risulta essere estremamente rara negli animali.

Più recentemente (20,21) nell'uomo sono state definite con maggiore chiarezza le molteplici anomalie congenite che si possono verificare in corso di gravidanze gemellari monozigotiche, sia in relazione alla maggior prominenza del sito di connessione, sia considerando come parametro di valutazione i rapporti che si instaurano fra il parassita e il co-gemello.

I mostri doppi sono stati quindi riclassificati come segue:

– gemelli congiunti la cui unione può verificarsi a livello dorsale (Craniopagus, Rachipagus e Pygopagus) o ventrale con fusione a livello rostrale (Omphalopagus, Thoracopagus, Cephalopagus), caudale (Ischiopagus) e laterale (Parapagus diprosopus e Parapagus dicephalus),
– gemelli congiunti parassiti: Omphalopagus o Thoracopagus, Cephalopagus, Ischiopagus, Parapagus, Craniopagus, Rachipagus e Pygopagus,
– fetus in fetus,
– teratoma,
– gemelli acardici.

Le duplicità unite asimmetriche o ineguali sono costituite da due individui uniti tra loro, dei quali il più sviluppato (Autosita) è pressoché normale, l'altro, più piccolo (Parassita), risulta di dimensioni ridotte rispetto al co-gemello o malformato e con caratteri di dipendenza.

Questo tipo di mostruosità è il risultato dell'unione epigastrica di un soggetto normale Autosita e di un Onfalosita parassita (Xifopagi).

Il parassita può essere quasi completo, sebbene di sviluppo ridotto (Eteropago), oppure

Acefalo, o ancora costituito soltanto dal treno posteriore o dai soli arti posteriori (Eterodelfi).

In altri casi, al contrario, il parassita è ridotto alla sola sua parte sopraombelicale, con più o meno gravi alterazioni dello sviluppo.

Infine, in alcuni rarissimi casi, un embrione, anche completo oppure completamente amorfo, si può trovare incorporato, in parte o totalmente, all'interno del gemello principale (foetus in foetu - mostri endocimi) (15).

Secondo la classificazione su base ostetrica di Isidore Geoffroy Saint Hilarie (22) le mostruosità fetali vengono suddivise in mostri unitari o semplici e mostri composti o doppi.

I mostri unitari sono individui più o meno deformati; in base alle loro peculiarità vengono definiti Autositi, Onfalositi e Parassiti.

I mostri composti, invece, sono individui saldati fra di loro e che condividono parti del corpo più o meno estese; a essi appartengono due categorie: gli Autositi e i Parassiti.

Gli autositi, per i problemi ostetrici correlati, si suddividono in Eusonfali e Mononfali; Sisomi e Monosomi; Sincefali e Monocefali.

I parassiti non sono altro che soggetti molto poco sviluppati, adesi al corpo di un individuo normalmente sviluppato (19).

Le mostruosità doppie congiunte o parallele sono state descritte nella maggior parte degli animali domestici. Le stesse risultano essere estremamente rare nei cavalli, occasionali nei cani e nei gatti, non comuni nei bovini, suini, limitate negli ovini (23).

Per quanto riguarda l'uomo, l'incidenza di gemellarità congiunte presenta un range di 1:50.000-1:100.000; recentemente, è stato osservato che, in una serie di 14 casi di diagnosi prenatale, il decesso dei gemelli avveniva nel 28% dei casi in utero, nel 54% subito dopo la nascita, e solo il 18% sopravviveva, con una prognosi che chiaramente dipendeva dal tipo e dall'estensione della fusione (24).

Passiamo ora a esaminare qualche malformazione frequente da riscontrarsi in patologia comparata.

Thoracopagus.

Questa malformazione deriva dall'unione all'estremità rostrale del primitivo disco embrionale, coinvolgendo il setto e l'abbozzo cardiaco; la successiva unione dei gemelli si estende dalla porzione superiore del torace verso l'ombelico. La testa e il cervello non sono coinvolti e di solito sono normali. Le cavità splancniche risultano uniche e gli organi del torace e dell'addome dei due embrioni parzialmente fusi o malformati, con un unico pacchetto intestinale. Gli arti risultano superiori sono in numero di due e spesso anomali, mentre gli arti posteriori possono risultare in numero di quattro (17).

Un caso di toracopagia è stato descritto in un mostro doppio bovino di sesso femminile caratterizzato da due teste, un unico corpo, quattro arti e diverse anomalie a carico di diversi sistemi organici derivanti dalla fusione di vari organi nonché diverse singole malformazioni (25).

Cephalotoracopagus (***Cephalothoracopagus syncephalus***)

E' una mostruosità doppia riferibile a "Crucipagia cefalica incompleta" caratterizzata da fusione frontale a livello della testa e del torace con assi vertebrali opposti formanti tra loro un angolo più o meno ampio (15).

In base ai piani di fusione e alle strutture coinvolte la cefalotoracopagia è stata classificata nei seguenti tipi:

a) Cephalothoracopagus simmetrico (Janiceps, Octopus janus, Faccia di Giano), caratterizzata da teste fuse frontalmente con le due facce disposte in posizione opposta, ognuna delle quali risulta formata dall'unione della metà della faccia di ciascun embrione;

b) Iniop Cephalothoracopagus (Octopus quadriauritus), nel caso in cui una delle due face risulta meno sviluppata e spesso caratterizzata soltanto dalle orecchie;
c) Deradelphous Cephalothoracopagus (Octopus biauritus), caratterizzata da un'unica faccia ben sviluppata (17,24, 26-28).

L'encefalo, gli organi del collo, del torace e dell'addome dei due embrioni risultano parzialmente fusi e malformati. Alcune volte la fusione delle due teste può essere notevole, per cui le due facce mancano completamente (29).

Nei casi di cefalotoracopagia descritti, l'esame radiologico rivelava l'unica voluminosa testa articolata ad atlanti non ben sviluppati, due rachidi per quanto diversamente malformati, un'unica cavità toraco–addominale/celomatica, due paia di arti anteriori/superiori, due paia di arti posteriori/inferiori, doppi cinti pelvici. Differenti risultavano, invece, le anomalie a carico degli organi interni, soprattutto per l'apparato gastro-enterico, nei tre casi descritti (30-32).

Nell'uomo, casi di cefalotoracopagia sono raramente descritti (33,34) e il 90% degli stessi presenta un unico sacco pericardico contenente due cuori con gradi variabili di fusione atriale e/o ventricolare, un singolo fegato condiviso, la predominanza di genitali femminili (21,35).

Il meccanismo di formazione di tali duplicità non è stato a tutt'oggi chiaramente delineato. È comunemente accettato che tali malformazioni risultino da una incompleta o ritardata divisione del disco embrionario monozigote (teoria della fissione nucleare). Pertanto, l'origine dei gemelli congiunti potrebbe consistere nell'unione di due embrioni inizialmente separati durante i primissimi stadi dello sviluppo embrionale (teoria della fusione). Recentemente, la genesi di tale condizione è stata invece correlata a una insufficiente separazione piuttosto che a un difetto di fusione (36,37).

I gemelli congiunti hanno una origine monozigotica (37) e nell'uomo si verificano all'incirca 13–14 giorni dopo la fertilizzazione quando le cellule fetali sono già parzialmente differenziate e risultanti in due gemelli incompletamente divisi (36).

Acardius acephalus

La malformazione definita come ''acardius acepalus'' fa parte dei mostri doppi asimmetrici parassiti in cui il co-gemello è unito all'altro solo attraverso il corion o il cordone ombelicale (18).

Nell'uomo, i mostri acardici rappresentano una grave anomalia congenita che si verifica in 1 caso su 35.000 nascite, in un caso su 100 gravidanze gemellari monozigotiche, e in un caso su 30 gravidanze trigemellari monozigotiche (38-40) e considerando il grado di sviluppo della testa, del tronco, degli arti e del tessuto cardiaco, per tali malformazioni sono stati definiti 4 tipi (39):

- *acardius anceps*, anomalia congenita che presenta il maggiore grado di sviluppo corporeo e costituita da un corpo, arti parzialmente o completamente formati, testa in parte sviluppata con tessuti cerebrali e strutture facciali;
- *acardius acephalus*, anomalia che si manifesta con maggiore frequenza rispetto agli altri tipi di mostruosità acardiche e caratterizzata da bacino e arti inferiori ben sviluppati, solitamente assenza del torace e degli organi addominali superiori ma possono essere presenti le costole e le vertebre, testa assente o ridotta a un abbozzo della base del collo;
- *acardius acormus*, che rappresenta la forma più rara di acardia, caratterizzata unicamente dallo sviluppo della testa;
- *acardius amorphus*, caratterizzato da una massa priva di forma da non poter essere definita come feto e contenente all'interno tessuto cutaneo, cartilagineo, osseo, muscolare, adiposo e vasi sanguigni.

Molti Autori sono concordi nel definire che, in corso di gravidanza gemellare monozigotica, per acardia si intende la sindrome caratterizzata da anastomosi vascolari in associazione con il parziale o incompleto sviluppo cardiaco di uno dei due gemelli. Basandosi su questo dato fu realizzata una semplice classificazione che suddivide tale malformazione fetale in:
– pseudoacardius, in cui è evidente una struttura cardiaca rudimentale;
– holoacardius, in cui non è presente alcuna struttura cardiaca (41,42).

Tale sindrome è meglio conosciuta come "twin reversed arterial perfusion" (TRAP sequence) che può considerarsi la forma più grave della "twin trasfusion sindrome" (TTTS) (43).

Le anastomosi vascolari localizzate a livello del corion e/o del cordone ombelicale alterano il decorso del flusso sanguigno fra i due gemelli.

Ciò comporta che il feto recante sviluppo completo assumerà il ruolo di "gemello donatore", che sarà responsabile della volemia di entrambi. In esso si instaura, quindi, un sovraccarico emodinamico, determinando insufficienza cardiaca congestizia, anemia ed eventuale prematurità e/o mortalità.

Il "gemello ricevente", per tale motivo, definito parassita, subirà delle alterazioni di sviluppo dovuti al tipo e al grado degli shunt che si vengono a creare. Inoltre il sangue si presenterà ipossico e povero di sostanze nutritive (44).

In letteratura umana molti Autori sono concordi sul fatto che i gemelli acardici siano solo la conseguenza di ampie anastomosi artero-arteriose e veno-venose, e che l'ostacolato ritorno venoso sia responsabile dell'incompleto sviluppo del gemello ricevente. Tale ostruzione determina l'instaurarsi dell' onfalocele (45).

In medicina veterinaria è riportato che tale malformazione è stata rinvenuta negli ovi-caprini (8), a volte anche semplicemente archiviata come materiale iconografico, non esistendo in realtà alcuna descrizione in merito; invece, casi di Acardius amorphus risultano riportati soltanto in bovini (46,47).

Recentemente un caso di acardius acephalus è stato descritto in un capretto appartenente a una gravidanza trigemellare comprendente altri due capretti di sesso maschile, morfologicamente normali, regolarmente portata a termine con parto eutocico da una capra di razza "Nera Messinese" pluripara. Sia l'esame anatomo-patologico sia l'esame radiologico evidenziavano come la malformazione fosse costituita da una sproporzionata area di tessuto molle, all'interno della quale si osservavano i due arti posteriori, il bacino, una porzione mal definita di rachide e tratti del sistema digerente e genito-urinario (48).

Monocephalus dipygus

Si tratta di una mostruosità doppia congiunta simmetrica (monosomico), che rappresenta l'unica varietà autentica della parapagia cefalica (15,49).

Tale mostruosità è caratterizzata dalla presenza di arti inferiori soprannumerari che si impiantano a livello del coxale con un costante sdoppiamento più o meno evidente degli organi pelvici.

I rachidi possono essere fusi fino alla regione lombare (seconda vertebra lombare) oppure per l'intera lunghezza. Sono, inoltre, presenti arti inferiori mediali perfettamente fusi per simelia e arti laterali normali, oppure solo questi ultimi.

Le forme minori di dipigia non sono rare nell'uomo e sono caratterizzate embriologicamente dalla duplicazione dell'intestino posteriore che produce sdoppiamento del colon e del seno uro-genitale.

Nelle forme più complete è presente una duplicazione totale del colon, del retto e dell'ano, con coinvolgimento dell'ileo terminale e cieco doppio che riporta due appendici. Gli organi

pelvici derivanti dal seno-urogenitale (vescica, gran parte della vagina ed uretra) e gli organi genitali esterni (vulva e pene) sono doppi. Il rachide è solitamente diviso inferiormente alla seconda vertebra lombare e il bacino è separato da un setto peritoneale sagittale che coinvolge anche i genitali interni.

Nelle forme incomplete la biforcazione del colon è più distale e i due colon restano solitamente intimamente accostati. Frequentemente si accompagna ad atresia rettale, ano imperforato o ectopia anale. In questo caso non è presente lo sdoppiamento degli organi genitali o lo stesso sdoppiamento risulta incompleto. Il rachide macroscopicamente risulta indiviso, ma esiste solitamente una duplicazione del midollo.

La dipigia è caratterizzata da difallia (verga doppia) in cui i due peni sono separati ma apparentemente riuniti e possiedono ciascuno un corpo cavernoso e un'uretra aggettante in una propria vescica. Le vesciche sono perfettamente separate da un setto sagittale, ricevono urine da un solo rene e esistono due sacche scrotali contenenti ciascuna un solo testicolo (15).

Le duplicazioni caudali sono state descritte sia nell'uomo che negli animali.

Nell'uomo la duplicazione caudale è una rara anomalia, le cui descrizioni in letteratura appaiono sin dal 1840 (12) e che conta, sino al 1996, una trentina di casi osservati (50).

Un caso completamente documentato è stato descritto nel 1968 da Rowe *et al*. (51) in una bambina con onfalocele, sdoppiamento dei genitali esterni, 2 aperture anali e 4 arti inferiori.

Più recentemente, è stato descritto un insolito caso di duplicazione caudale con sei arti inferiori, artrogriposi e vescica gigante riscontrato in un feto umano tramite diagnosi ultrasonografica in una gestante di 36 anni alla ventunesima settimana di amenorrea (52).

Molte teorie sono state proposte per la genesi di questa rara anomalia. Se lo zigote si divide tra l'ottavo e il tredicesimo giorno dalla fecondazione, la duplicità risulta essere completa (53).

Se invec, il disco embrionale si divide più tardi, la divisione risulta usualmente incompleta e i gemelli possono essere congiunti (54,55).

Per quanto riguarda la medicina veterinaria, mostri doppi monocefali dipigi sono stati descritti in bovini (56,57), bufali (58,59), ovini (60) e caprini (49).

Anche in campo veterinario sono state segnalate sporadiche particolarità. Tra queste, in un vitello Holstein-Friesian maschio è stata osservata e descritta, sia macroscopicamente sia radiologicamente, una duplicazione caudale caratterizzata da quattro arti posteriori, di cui i mediali sottosviluppati, e da un ulteriore arto anteriore rudimentale articolato alla regione pelvica tra i due arti "soprannumerari" mediali. Tale arto era costituito da un omero sottosviluppato, ulna duplicata, diverse ossa carpali, un metacarpo parzialmente duplicato e tre dita con tre unghioni. L'arto risultava connesso a due set di ossa coxali da un osso irregolarmente formato e considerato essere una vertebra e coste vestigiali. Inoltre, erano anche presenti due peni e scroti, tre reni e tre testicoli. In questo caso, la mostruosità era stata classificata come dipygus associato a pygopagus parasiticus (57).

Un caso particolare di duplicazione congenita del tipo monocephalus dipygus è stato recentemente descritto in un capretto. Il soggetto presentava due pelvi, con anormalità di sviluppo, e quattro arti pelvici, di cui i due soprannumerari articolati sul lato destro e sottosviluppati, parziale duplicazione della colonna vertebrale tra la quarta e la sesta vertebra lombare, atresia anale e palatoschisi, quest'ultima mai segnalata in casi di duplicazioni caudale (49).

Anche un caso è stato segnalato in un cucciolo di cane meticcio, maschio, nato vivo e a termine di gestazione da una cagna meticcia di circa 8 anni d'età, pluripara, che nei parti precedenti non aveva mai partorito cuccioli malformati. La malformazione sul piano macroscopico era caratterizzata da un arto soprannumerario che emergeva dal perineo in luogo della coda malformazioni intestinali e del sistema genito-urinario. L'esame radiologico evidenziava come l'arto soprannumerario fosse del tutto simile all'arto posteriore destro, ma

con l'assenza di tibia e fibula e la presenza di tre metatarsi con le rispettive falangi. (61).

In accordo con Dennis e Leipold (62), i difetti congeniti degli animali sono più comuni di quanto realmente riportato in bibliografia, in quanto, a causa dei sistemi di allevamento, gli stessi non vengono sottoposti all'attenzione degli studiosi perché eliminati dallo stesso allevatore.

Al pari della medicina umana, sarebbe auspicabile l'utilizzo, ad esempio, della diagnostica per immagini nello studio delle malformazioni animali. Nell'uomo, infatti, la diagnosi prenatale della malformazione viene effettuata essenzialmente con l'ausilio della diagnostica per immagini, in particolar modo con ecocolordoppler per valutarne la circolazione, la disposizione e le eventuali connessioni fra gli invogli fetali (63).

Infine, un recente studio epidemiologico a livello mondiale (64), raccogliendo i dati provenienti dai diversi Paesi partecipanti, ha permesso di valutare il numero di tipi di gemellarità congiunte e la loro proporzione.

I risultati hanno evidenziato, su un totale di 383 casi di gemelli congiunti, le seguenti percentuali:

Tipo	N. di casi	%
Thoracopagus	161	42,0
Parapagus dicephalus	44	11,6
Cephalopagus	21	5,5
Omphalopagus	21	5,5
Parasitic	15	3,9
Craniopagus	13	3,4
Parapagus diprosopus	11	2,9
Ischiopagus	7	1,8
Rachipagus	4	1,0
Pygopagus	4	1,0
Non specificato	82	21,4

Bibliografia

1. PECORARI D, DIANI F, TANGANELLI E (1992) - Patologia feto-neonatale collegata con l'ambiente intrauterino e col parto. In: Medicina dell'età prenatale e del puerperio. II Edizione Piccin, 9, pp. 184-227.
2. DOUVAL-DESNOËS O (2007) - Teratologia dei Ruminanti: anomalie congenite dei ruminanti. *Summa Animali da Reddito*, www.pointvet.it , 10:36-43.
3. BORRELLI AL, VENTRUTO V, BORRELLI P (2007) – Difetti congeniti. In:Borrelli AL, Arduini D, Cardone A, Ventruto V, Medicina dell'età prenatale: prevenzione, diagnosi e terapia dei difetti congeniti e delle principali patologie gravidiche. Springer, pp.13-28.
4. SAPERSTEIN G, LEIPOLD HW, DENNIS SM (1975) - Congenital defects of sheep. *JAVMA,* 167(4):314-322.
5. LONG S (2001) - Abnormal development of the conceptus and its consequences. In: Noakes DE, Parkinson TJ and England GCW: Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. VIII Edition Saunders WB, London, pp. 119-143.
6. LEIPOLD HW, HUSTON K, DENNIS SM (1983) - Bovine congenital defects. *Adv. In vet. Sc. And Comp. Medicine*, 27:197-271.
7. PELAGALLI GV & CASTALDO L (1998) - Embriologia morfogenesi e anomalie dello sviluppo. Gnocchi Editore srl, Napoli.
8. BIAVATI S (1997) - Alterazione dello sviluppo embriofetale. In: Marcato PS, Anatomia e istologia patologica veterinaria. III Edizione Esculapio, Bologna, pp. 537-555.
9. SCHWALBE E (1907) - Die doppelbildungen. In: Die morphologie der missbildungen des menschen und der tiere, E. Schwalbe Ed., Fusher, Jena, vol. 2, pp. 1906-1937.
10. NODEN DM, DE LAHUNTA A (1985) - The Embryology of Domestic Animals, Development Mechanisms and Malformations. MD: Williams and Wilkins, Baltimore.
11. WILLHITE CC, ROSSI NL, FRAKES RA, SHARMA RP (1985) - Cranioschisis aperta with encephaloschisis in cephalothoracopagus hamster twins. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 49:195-201.
12. BISWAS A, CHIA D, WONG YC (2001) - Three-dimensional sonographic diagnosis of cephalothoracopagus janiceps twins at 13 weeks. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 18:289-290.
13. ZIMMERMANN AA (1967) - Embryologic and anatomic consideration of conjoined twins. *Birth defect*, Orig Artic Ser, 3:18-27.
14. MARCATO PS (2002) - Patologia sistematica veterinaria, Edagricole, Bologna.
15. DUHAMEL B (1966) - Morphogenèse Pathologique, Masson & C., Paris.
16. GUTTMACHER AF & NICHOLS BL (1967) - Teratology of conjoined twins. *Birth defect*, Orig Artic Ser, 3:3-9.
17. SPENCER R (1996) - Anatomic description of conjoined twins: a plea for standardized terminology. *Journal of Pediatric Surgery*, 31:941-944.
18. BALDWIN VJ (1992) – Pathology of multiple pregnancy. In: Dimmick JE and Kalousek DK. Developmental pathology of the embryo & fetus. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 320-340.
19. JEANTY P (1992): www.thefetus.net, Accesso 06/08/2008.
20. KINGSTON CA, MCHUGH K, KUMARADEVAN J, KIELY EM, SPITZ L (2001) - Imaging in the preoperative assessment of conjoined twins. *Radiographics*, 21:187-208.
21. SPENCER R (2001) - Parasitic conjoined twins: external, internal (fetuses in fetu and teratomas) and detached (acardiacs). *Clinical Anatomy*, 14:428-444.
22. GEOFFROY SAINT-HILAIRE I (1832-37) - Histoire générale et particulière des anomalies de l'organisation chez l'homme e les animaux.
23. FISHER KRS, PARTLOW GD, WALKER AF (1986) - Clinical and Anatomical Obser-

vations of a Two-Headed Lamb. The Anatomical Record, *214*, 432-440.
24. SPITZ L, KIELY E (2003) - Conjoined twins. *Journal of the American Medical Association*, 289:1307-1310.
25. MAZZULLO G, CAMPO A, MACRÌ B (1995) – Mostruosità doppia in un bovino. Contributo casistico. *Rivista di Parassitologia*, 13(57):141-149.
26. OTTO AG (1841) - Monstra partibus superioribus coalitis, inferioribus divisis. Monstrorum sexcentorum descriptio anatomica Vratislaviae, Slovakia: *Sumptibus Ferdinandi hirt*, 179-216.
27. BARR M Jr (1982) - Facial duplication: case, review, and embryogenesis. *Teratology*, 25:153-159. 15.
28. SPENCER R (2000) - Theoretical and analytical embryology of conjoined twins, part 1: embryongenesis. *Clinical anatomy*, 13:36-53.
29. PELAGALLI G (1982) - Embriologia e teratologia. Idelson, Napoli.
30. MAZZULLO G, MONTALBANO G, AUGELLO A, GERMANÀ A, MACRÌ B (2007) - A case of conjoined cephalopagus twinning in an ostrich (Struthio camelus) *Anat. Histol. Embryol*., 36(4):263-5.
31. MAZZULLO G, MACRÌ F, RAPISARDA G, MARINO F (2009) - Deradelphous Cephalothoracopagus in Kittens. *Anat. Histol. Embryol*., 38:327-329.
32. LANTERI G, MACRÌ F, MARINO F, CARACAPPA S, MAZZULLO G (2013) - A rare case of Deradelphus Cephalo-Thoracoomphalopagus in lamb. *Anat. Histol. Embryol*., 42:394–397.
33. KOKCU A, CETINKAYA MB, AYDIN O, TOSUN M (2007) - Conjoined twins: historical perspective and report of a case. *J. Matern. Fetal Neonatal Med*., 20:349–356.
34. AKINOLA RA, OTTUN TA, TAYO AO, AKANJI AO, AKINOLA OI (2010) - Prenatal ultrasonic diagnosis of conjoint twins. *Afr. J. Paediatr. Surg*., 7:110–113.
35. HAMDAN MA, BEGAM M, MIRGHANI HM (2010) – Inseparable thoraco-omphalopagus twins. *Pediatr. Cardiol.,* 31:1252–1253.
36. KAUFMAN MH (2004) - The embryology of conjoined twins. *Child. Nerv. Syst*., 20: 508–525.
37. SPIERS ZB, BIDDLE AJ, GABOR MJ, LEE E, GABOR LJ (2010) - Monocephalic thoracopagus tetrabrachius in twin lambs. *Can. Vet. J*., 51:1037–1039.
38. JAMES WH (1977) - A note on the epidemiology of acardiac monsters. *Teratology*, 16:211-216.
39. NAPOLITANI FD, SCHREIBER I (1960) - The acardiac monster. A review of the word literature and presentation of 2 cases. *Am J Obstet Gynecol*, 80:582-589.
40. GUTTMACHER AF (1956): Factor affecting normal expectancy of conception. *JAMA*, 161: 855-860.
41. TAN TYT, SEPULVEDA W (2003) - Acardiac twin: a systematic review of minimally invasive treatment modalities. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 22:409-419.
42. WONG AE, SEPULVEDA W (2005) - Acardiac anomaly: current issues in prenatal assessment and treatment. *Prenat Diagn*, 25:796-806.
43. COHEN K, RATHOD M, FERRIMAN E (2010) - Twin pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*, 20 259–264.
44. TORRES BORREGO J, CABANA J, BERRAL A, ACOSTA COLLADO A, ROMANOS LEZCANO A (2000) - Acardius acephalus. Descripciòn de un caso. *An Esp Pediat*, 53(4):346-349.
45. CHI JE G (1989) – Acardiac twins. J Corean Med Sci, 4(4):203-216.
46. HISHINUMA M, TAKAHASHI Y, KANAGAWA H (1987) - Histological and cytogentical observations on a bovine acardius amorphous. *Jnp J Vet Sci*, 49(1):195-197.
47. HIRAGA T, ABE M, IWASA K, TAKE HANA K (1989) - Anatomical investigation of 39

cases of congenital duplication in calves. *Cong Anom*, 29:139-149.
48. MACRÌ F, LANTERI G, FERRARO S, MARINO G, MAZZULLO G (2013) - Acardius acephalus in a goat kid – radiological and gross findings: a case report. *Veterinarni Medicina*, 58(11):591–593
49. CORBERA JA, ARENCIBIA A, MORALES I, GUTIERREZ C (2005) - Congenital Duplication of the Caudal Region (Monocephalus Dipygus) in a Kid Goat. *Anat. Histol. Embryol*., 34:61–63.
50. ULMAN I, AVANOGLU A, ERDENER A, SAHIN AH, IZMIR AG (1996) - Evaluation of the Lower Urinary Tract Function in Caudal Duplication (Dipygus) Anomaly. *J Pediatr Surg*, l31(2):1680-1682.
51. ROWE MI, RAVITCH MM, RANNIGER K (1968) - Operative correction of caudal duplication (dipygus). *J Pediatr Surg*, 63:840.
52. LA TORRE R, FUSARO P, ANCESCHI MM, MONTANINO-OLIVA M, MODESTO S, COSMI EV (1998) - Unusual Case of Caudal Duplication (Dipygus). *J Clin Ultrasound*, 26(3):163-165.
53. HARPER RG, KENIGSBERG K, SIA CG, ET AL (1980) - Xiphopagus conjoined twins: a 300-year review of the obstetric morphopathologic, neonatal, and surgical parameters. *Am J Obstet Gynecol*, 137:617.
54. SARIHAN H, MOCAN H, ASLAN MK, ET AL (1979) - Dipygus (caudal duplication). *J Pediatr Surg*, 14:1517.
55. VAN DEN BRAND SFJJ, NIJHUIS JG, VAN DONGEN PW (1994) - Prenatal ultrasound diagnosis of conjoined twins. *Obstet Gynecol Surv*, 49:656.
56. HAKUR SB (1988) - Dipygus monstrosity in a calf. *Indian Vet. J*., 65:440.
57. HIRAGA T, ABE M, IWASA K, TAKEHANA K, TETSUKA M (1989) - Seven-legged calf-dipygus with an extra foreleg at the pelvic region. *Jpn J Vet Sci*, 51:1011–1015.
58. THAKARE AG, SARODE DB, SAHARE JS, KAIKINI AS (1992) - Dicephalus dipygus monster in Nagpuri buffalo. *Indian J Anim Reprod*, 13:200.
59. ANTOINE D, MURUGAVEL K, ALPHONSE RMD, RAMALINGAM S, THANDAVAMURTHY C (1997) - Monocephalus dipygus monster in a buffalo - a case report. *Ind J Anim Reprod*, 18:166.
60. DOIJODE SV, THORAT NH, MARKANDEYA NM, NAMDE CS (1992) - Monocephalus dipygus conjoined twin lamb. *Indian J. Anim. Reprod*., 13, 206.
61. MAZZULLO G, MONTEVERDE V, MACRÌ F, PARTANNA S, CARACAPPA S (2007) - Incomplete caudal duplication in a puppy: gross and radiological observations. *Journal of Small Animal Practice*, 48(7):410-3.
62. DENNIS SM & LEIPOLD HW (1979) – Ovine congenital defects. *Vet Bul,* 49(4):233-239.
63. POUEHÈ D, GALTIER JL, RIQUE M (1999) - Foetus acardiaque acèfale et grossesse gèmellaire - a propos d'un cas. *J Gynecol obstet biol reprod,* 28:275-277.
64. MUTCHINICK OM, LUNA-MUÑOZ L, AMAR E, BAKKER MK, CLEMENTI M, COCCHI G, DA GRAÇA DUTRA M, FELDKAMP ML, LANDAU D, LEONCINI E, LI Z, LOWRY B, MARENGO LK, MARTÍNEZ-FRÍAS ML, MASTROIACOVO P, MÉTNEKI J, MORGAN M, PIERINI A, RISSMAN A, RITVANEN A, SCARANO G, SIFFEL C, SZABOVA E, ARTEAGA-VÁZQUEZ J. (2011) - Conjoined twins: a worldwide collaborative epidemiological study of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*., 157C(4):274-87.

L'IPERTERMIA MALIGNA NELL'UOMO E NEL SUINO

ELENA CANELLI, PAOLO BORGHETTI, PAOLO MARTELLI

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università degli Studi di Parma

Introduzione

L'ipertermia maligna (*malignant hyperthermia*, MH) è una patologia che si manifesta con rigidità dei muscoli scheletrici, tachipnea, ipercapnia, rapido aumento della temperatura corporea, grave acidosi metabolica e aritmia (Brunson e Hogan, 2004). A oggi, non è più considerata una singola malattia ma piuttosto una sindrome (*malignant hyperthermia syndrome,* MHS), caratterizzata da una cascata di fenomeni fisiopatologici a eziologia genetica e ambientale (Brunson e Hogan, 2004). Il termine "ipertermia maligna" viene tuttora impropriamente utilizzato sulla base dei primi casi riportati nell'uomo, quando venivano diagnosticati solo episodi gravi e a rapido decorso.

I primi casi nell'uomo risalgono all'inizio del 1900, anche se per riconoscere un coinvolgimento degli anestetici come fattore scatenante si dovette aspettare sino agli anni '60 del secolo scorso. Una malattia simile alla MH umana è stata descritta anche in diverse specie animali quali cani, suini, gatti ed equini, geneticamente predisposti, come risposta metabolica anomala ad agenti anestetici quali alotano, isofluorano, sevoflurano, desflorano (Berman *et al*., 1969; De Jong *et al*., 1974; McClure *et al*., 1975; Kirmayer *et al*., 1984).

Nei primi anni '60 del secolo scorso, nel suino, è stata identificata un'entità nosologica simile alla MH dell'uomo, definita "sindrome da stress". La patologia veniva frequentemente ricompresa nell'accezione della sindrome "morte improvvisa" con comparsa secondaria a situazioni di stress, quali il trasporto verso i siti di macellazione o i rimescolamenti degli animali nei gruppi.

All'esame anatomo-patologico, così come in sede di macellazione, i muscoli dei maiali colpiti apparivano pallidi, non compatti, con essudazione di un fluido chiaro, da cui la denominazione di carni PSE (*pale-soft-exudative*) gravemente compromesse in termini qualitativi, tale da impedirne un'idonea commercializzazione sia per il consumo diretto che per la trasformazione salumiera. Questo aspetto patologico, con elevato impatto economico per la forma associata alla macellazione, suscitò un forte interesse nell'ambito della ricerca per cui si addivenne ad associare la condizione PSE con una sensibilità all'esposizione ad alotano e succinilcolina e, da qui, fu chiara la marcata analogia con la MH umana (Brunson e Hogan, 2004).

Nei suini sensibili, la malattia assume un decorso rapido e grave, con forte similitudine con la forma nell'uomo. Nel cane, invece, molti dei sintomi riscontrabili nella MH umana e suina non sono presenti (Nelson, 1991), mentre nel cavallo i sintomi e il decorso sono spesso a lenta insorgenza ed evoluzione (Manley *et al*., 1983).

Il suino come modello per l'ipertermia maligna: la storia

L'analogia clinica e fisiopatologica della MH suina con quella umana offre un modello animale utile per investigare l'eziologia e le procedure diagnostiche, per valutare il potenziale terapeutico e profilattico di alcuni farmaci e la sicurezza o la pericolosità degli anestetici (Nelson *et al*., 1976).

Fin dall'inizio delle ricerche riguardanti la fisiopatologia della MH, il suino è stato utilizzato come modello animale (Brandom, 2006).

Alla fine degli anni '60 del secolo scorso in un laboratorio in Sud Africa, mentre si stava mettendo a punto il trapianto di fegato utilizzando il suino come modello sperimentale, durante l'anestesia con alotano, alcuni suini morirono improvvisamente. Il quadro clinico, la sua evoluzione e le lesioni riscontrate rispecchiavano quelli della malattia nota nell'uomo come ipertermia maligna. L'evento fu significativo: si decise quindi di utilizzare il suino come modello di studio per l'ipertermia maligna dell'uomo e in particolare per lo studio della progressione della malattia e per la messa a punto dei trattamenti, considerando che l'ipertemia maligna nell'uomo è una patologia rara e non prevedibile.

Dalle ricerche condotte risultò però evidente che altri fattori erano in grado di intervenire nel determinismo delle manifestazioni di MH in suini sensibili. Si scoprì che condizioni genericamente riportabili a varie forme di stress (lotta, movimentazioni, coito, temperature ambientali elevate, ecc.) inducevano MH. Il suino si dimostrò quindi un modello adatto, ma non perfetto, per riprodurre la MH umana.

A partire dagli anni '70 del secolo scorso si capì che i suini selezionati per alcuni tratti genetici quale la massa magra e lo spiccato incremento ponderale, genericamente definiti "muscular", presentavano MH in seguito all'esposizione ad alotano.

Non fu comunque immediata l'associazione tra geni responsabili di "muscolarità" (masse muscolari particolarmente sviluppate) e le manifestazioni della malattia. Studi genetici dimostrarono la presenza di una mutazione genica a cui si associava sia la caratteristica fenotipica sia la predisposizione a MH. Grazie a questa scoperta si decise di sottoporre a screening una certa quota della popolazione destinata a selezione e miglioramento genetico in modo da escludere dalla riproduzione animali portatori del "gene alotano" eliminando, di fatto, il problema della MH nel maiale.

Nel 1970, gruppi di ricerca multidisciplinari, guidati da un farmacologo e un anestesista in Canada, e da un anestesista e un neuropatologo in Inghilterra, decisero di sviluppare un test bioptico che fosse in grado di prevedere la suscettibilità alla MH.

Sempre utilizzando il maiale come modello comparato, studi di fisiologia muscolare evidenziarono differenze nelle risposte di contrattura muscolare alla caffeina e all'alotano nei soggetti sensibili; in seguito a tali studi, si sviluppò il test di contrattura *in vitro* (*in vitro contracture test*, IVCT), oggi tecnica di routine per la diagnosi di MH.

Nel 1975 il modello suino venne utilizzato per sottoporre a test una nuova molecola con proprietà miorilassanti, il dantrolene e in particolare fu valutata la sua capacità di arrestare la "cascata metabolica" indotta dalla MH. Il successo del drantolene nel trattamento dell'ipertermia maligna nei suini (Fairhurst *et al*., 1980) ha aperto la strada alla sua applicazione nel trattamento della MH acuta dell'uomo.

Eziologia

L'ipertermia maligna si definisce come un disordine farmacogenetico del muscolo scheletrico che, in soggetti geneticamente predisposti, si presenta come una risposta metabolica eccessiva (Hopkins, 2011) alla somministrazione di anestetici gassosi volatili come alotano, sevofluorano, desfluorano, isolfluorano e a miorilassanti depolarizzanti come la succinilcolina.

Studi effettuati sul reticolo endoplasmatico isolato da suini con MH evidenziarono un'alterazione del sito recettoriale della rianodina (RYR-1) o canale di rilascio del calcio del muscolo scheletrico (Mickelson *et al*., 1988). Questo canale è strettamente associato ad altre proteine che ne modulano/influenzano le funzioni, come il recettore diidropiridina del canale del calcio, situato a livelli di tubolo T del sarcolemma, che media il cambio di voltaggio verso il recettore RYR1.

A oggi, nell'uomo, si riconoscono quattro geni potenzialmente associati a MH e in particolare due geni (RYR1 e CACNA1S, la subunità $\alpha 1$ del recettore diidropiridina-voltaggio dipendente) sono stati definitivamente associati a mutazioni correlate alla sindrome (Rosenberg *et al*., 2015).

Nel gene RYR1, posto sul cromosoma 19, sono state identificate più di 60 mutazioni e fino a 6 nel gene CACNA1S. Ciononostante, una buona percentuale delle famiglie sensibili a MH non presenta mutazioni a livello di cromosoma 19, evidenziando l'eterogenicità genetica della malattia.

Oltre all'uomo e al suino, una mutazione casuale nel gene RYR1 è stata identificata anche in una famiglia di cani di razza ibrida MH-sensibili (Roberts *et al*., 2001).

Nel suino, la predisposizione all'ipertermia maligna è associata a un difetto autosomico recessivo causato da una singola mutazione puntiforme nel gene RYR1 del muscolo scheletrico (Rosenberg e Fletcher, 1994). La mutazione, che consiste in una sostituzione T1843C sul cromosoma 6, è stata rilevata in più di 450 suini rappresentativi di 6 differenti linee genetiche (Fujii et al., 1991; Houde e Pommiere, 1993) e causa una transizione cisteina-arginina in posizione 614 del prodotto genico RYR1 (Arg614Cys). La mutazione analoga nell'uomo, C1840T, è presente in circa il 5% dei pazienti colpiti.

Nel suino, la condizione è recessiva e quindi richiede la mutazione di entrambi gli alleli perché ci sia l'espressione clinica, mentre la mutazione nell'uomo è dovuta a un fenotipo autosomico dominante e quindi è sufficiente la mutazione in un singolo allele.

A differenza dell'uomo, gli eterozigoti suini non manifestano MH clinica e non risultano positivi a IVCT (Claxton-Gill *et al*., 1993). Contrariamente, gli omozigoti per la mutazione T1843C esprimono una sintomatologia fulminante nel momento in cui vengono esposti all'alotano in un "*Barnyard Challenge Test*".

Nonostante l'identificazione della mutazione nel suino giochi un ruolo chiave nella comprensione della malattia nell'uomo, ciò ha una importanza relativa per l'anestesia in medicina veterinaria, dato che sono state selezionate linee genetiche prive di tale mutazione e in quanto l'uso dell'anestesia gassosa nel suino è assai infrequente.

Numerosi altri fattori sono stati riconosciuti come elementi scatenanti la comparsa della malattia o come fattori di rischio. Tra questi spiccano l'età, il tipo di anestetico, la temperatura ambientale, la simultanea somministrazione di sedativi, il corredo genetico e il tipo di stress (Ording, 2000).

Mentre negli animali molte condizioni ambientali sono state dimostrate essere un "detonatore" per l'aumento del rilascio del calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico (SR), nell'uomo i fattori stressanti come l'esercizio fisico, gli sforzi o il calore sono a oggi ancora oggetto di dibattito. Ciononostante, le correlazioni genotipo-fenotipo sono deboli sia per l'espressione clinica della MH sia per la risposta del muscolo a caffeina e alotano, e rimane quindi evidente la considerazione che una vasta gamma di fattori possa influenzare o modulare la comparsa della sindrome MH, anche se la comunità scientifica non è ancora del tutto concorde sul reale ruolo di questi potenziali fattori di rischio.

Epidemiologia e sintomatologia

Nell'ipertermia maligna, le manifestazioni cliniche e le alterazioni dei parametri di laboratorio sono dovuti a un incontrollato rilascio intracellulare di calcio dal SR del muscolo scheletrico (Jiang *et al*., 2008). La contrattura muscolare, il rilascio di cationi ed enzimi in circolo e la produzione di calore possono essere ricondotti a livelli patologici di calcio intracitoplasmatico. La MH si può manifestare in qualunque momento durante l'anestesia e nel primo periodo post-operatorio, non oltre un'ora dall'interruzione dell'uso di anestetici (Litman *et al*., 2008).

Nell'uomo, l'incidenza degli episodi di MH durante l'anestesia è tra 1:10.000 e 1:250.000 e, in media, la sindrome compare non prima di essere stati sottoposti a tre anestesie. Gli uomini sviluppano la malattia più frequentemente delle donne (2:1), con un'incidenza maggiore nei giovani, senza distinzione di etnia o distribuzione geografica. All'esordio compare tachicardia, aumento della concentrazione di anidride carbonica espirata nonostante un aumento della ventilazione, rigidità muscolare, aumento della temperatura corporea, con conseguente incremento del consumo di ossigeno, produzione di CO_2, e disfunzione diffusa degli organi vitali. L'acidosi respiratoria che si instaura è seguita, in molti casi, da acidosi metabolica. Se non trattata, la rabdomiolisi genera iperkaliemia e mioglobinuria, che può esitare in un'insufficienza renale acuta. La morte può sopraggiungere a seguito di insufficienza cardiaca e coagulazione intravasale disseminata (CID), per valori di temperatura corporea prossimi o superiori a 41°C (Rosenberg *et al*., 2015).

Nella specie suina, l'aumento della temperatura corporea e la rigidità muscolare sono i segni clinici più evidenti. Tachicardia, tachipnea, ipossiemia, aritmia cardiaca, mioglobinuria, ipercaliemia, diminuzione dell'output cardiaco con ipotensione e acidosi metabolica precedono di poco l'*exitus* dell'animale (Anderson e Jean, 2012). Nei primi minuti dopo l'inalazione di alotano, il suino MH-predisposto sviluppa un aumento progressivo del tono del muscolo scheletrico fino alla rigidità pressoché completa. Il respiro aumenta rapidamente di profondità e frequenza. Anche la frequenza cardiaca aumenta sino a raggiungere e superare i 180 bpm in associazione a un iniziale aumento della pressione arteriosa, che tende poi a diminuire in modo significativo. Le alterazioni del ritmo cardiaco si caratterizzano dapprima per una tachicardia sinusale a cui fa seguito tachicardia ventricolare, contrazione ventricolare multifocale prematura, fibrillazione ventricolare fino ad asistolia. La temperatura corporea aumenta anche oltre i 42°C. Le analisi di laboratorio rivelano una forte acidosi lattica, ipercaliemia, ipercapnia e aumento dell'attività della CK (Brunson e Hogan, 2004). Alla morte, la cute assume colorazioni anomale alternando aree ischemiche a cianosi e iperemia.

Diagnosi

Per formulare una diagnosi clinica è necessaria la contemporanea presenza di almeno tre dei seguenti sintomi: aritmia cardiaca, acidosi, ipercapnia, ipertermia, aumento della concentrazione di anidride carbonica espirata (etCO2) e rigidità muscolare. Poiché ogni sintomo preso da solo non è patognomonico, si deve procedere a considerare ipotesi diagnostiche differenziali (Brunson e Hogan, 2004) e, inoltre, la variabilità nell'ordine e nelle tempistiche di insorgenza dei sintomi spesso rende la diagnosi clinica complessa.

Nell'uomo è stata istituita una *grading scale* (Larach *et al*., 1994) per la diagnosi, che tiene conto di rigidità muscolare, *breakdown* muscolare, acidosi respiratoria, aumento di temperatura e coinvolgimento cardiaco.

Poiché quasi tutti i pazienti predisposti a MH non presentano alcuna modificazione fenotipica, è impossibile diagnosticare la sensibilità alla sindrome senza l'esposizione agli anestetici "innesco" o l'esecuzione di specifici test di laboratorio (Rosenberg *et al*., 2015). Il *gold standard* per la diagnosi di sensibilità è, a oggi, il test di contrattura *in vitro* (*in vitro* contracture test-IVCT) che si basa sulla contrattura delle fibre muscolari in presenza di alotano o caffeina.

La specificità del test può essere inficiata da disordini muscolari non correlati alla MH, che inducono un aumento della concentrazione di calcio nella fibrocellula muscolare. Inoltre l'ICTV è un test costoso, eseguito solo in laboratori specializzati, che richiede una procedura chirurgica e che può esitare in falsi positivi o negativi.

Per questa ragione sono quindi stati valutati altri protocolli diagnostici (test della rianodina), che hanno però incontrato altre difficoltà, non ultimi problemi etici, stante la necessità di

iniettare agenti di innesco e stabilire valori di cut-off/sensibilità individuale.

Le analisi del DNA rappresentano invece una moderna alternativa all'ICTV e richiedono solo un prelievo di sangue che può essere inviato a un laboratorio accreditato. A oggi il 50-70% della predisposizione a MH è risultato correlato a RYR1, con più di 400 varianti identificate e associate a MH (ClinVar-National Center for Biotechnology Information, 2015). Inoltre, l'avvento delle tecniche di *next generation sequencing* permette una diagnosi a livello di intero genoma e un'efficace piattaforma per la scoperta di nuove varianti a costi sostenibili (Stowell, 2014).

La diagnosi genetica non è comunque scevra da problemi: a causa dell'eterogeneità della sindrome, per cui un risultato negativo al test del DNA non può escludere con certezza la predisposizione a MH (Robinson *et al*., 2003). Inoltre, solo quelle varianti che sono state caratterizzate dal punto di vista biochimico in grado di procurare il rilascio di calcio nel SR possono essere utilizzate per valutare la predisposizione a MH (Rosenberg *et al*., 2015).

Nonostante due geni siano stati inequivocabilmente associati a MH, esistono discordanze riguardo i risultati dei test genetici e il potenziale coinvolgimento di altri geni non può essere escluso. In generale l'utilizzo associato di test del DNA e IVCT permette di individuare un numero maggiore di veri positivi.

A oggi i test molecolari sono in grado di identificare le mutazioni causali anche nel suino, ma spesso il test e la conferma non sono rapidamente disponibili. Gli animali sospetti per MH possono essere sottoposti a IVCT, anche se, come per l'uomo, il test non è del tutto affidabile e un risultato negativo non esclude la MH.

Trattamento

In corso di MH acuta nell'uomo il primo trattamento da effettuare è l'interruzione del fattore scatenante, seguito da iperventilazione, somministrazione di dantrolene e raffreddamento. Il dantrolene è l'unico farmaco per il trattamento della MH (Larach *et al*., 1993) agendo attraverso l'inibizione di DHPR in modo RYR1 indipendente (Bannister, 2013). L'uso di miorilassanti non depolarizzanti in un episodio acuto può essere di supporto per bloccare la depolarizzazione a livello della giunzione neuromuscolare e il successivo rilascio di calcio da parte del SR. Nel caso in cui non sia disponibile il dantrolene, questi farmaci possono essere utilizzati per interrompere l'inizio della contrazione muscolare indotta da MH (Rosenberg *et al*., 2015).

La somministrazione di fluidi è quindi di fondamentale importanza dal momento che ipovolemia e ipotensione sono caratteristiche comuni di una MH in stadio avanzato. Il monitoraggio intensivo durante il trattamento della MH deve prevedere il monitoraggio della pressione arteriosa e l'emogasanalisi, per indirizzare la somministrazione di liquidi. Inoltre, lo stato acido-base, l'attività di CK, i livelli sierici degli elettroliti, lattato e glucosio devono essere oggetto di costante valutazione. L'ECG è utile per rilevare aritmie o in caso di sospetto di MH.

Il raffreddamento è una terapia di supporto di utilizzo controverso, perché promuove vasocostrizione periferica e può ritardare l'effetto del dantrolene sul muscolo scheletrico.

Nel caso di pazienti di cui sia nota la predisposizione a MH, l'anestesia dovrebbe essere condotta a livello regionale o locale; se sottoposti ad anestesia generale si dovrebbero usare rilassanti muscolari non depolarizzanti e agenti anestetici intravenosi.

Fermo restando che le principali linee genetiche di suini oggi in commercio sono state selezionate per l'assenza del gene correlato a MH, la sua comparsa è evento del tutto eccezionale, per cui il trattamento individuale del suino affetto da MH rimane una pratica non comune.

In generale valgono le stesse regole che si applicano per il trattamento umano: vanno evitati tutti gli anestetici volatili, tra i quali alotano, isoflurano e sevoflurano, e i farmaci bloccanti neuromuscolari depolarizzanti. Gli anestetici sicuri includono barbiturici, propofol, far-

maci dissociativi, oppioidi, protossido di azoto, bloccanti neuromuscolari non depolarizzanti e anestetici locali. Le procedure anestetiche locali o generali per via intravenosa possono essere utilizzate in modo sicuro. Nella gestione di un animale MH-positivo o sospetto, è importante utilizzare una premedicazione efficace per ridurre al minimo lo stress preanestetico, inoltre devono essere associati adeguati sedativi, poiché lo stress da eccessivo contenimento potrebbe essere sufficiente, da solo, a innescare la sintomatologia della MH (Brunson e Hogan, 2004; Anderson e Jean, 2012).

Bibliografia

- Larach MG 2005, Breakthroughs in Bioscience - Making Anesthesia Safer: Unraveling the Malignant Hyperthermia Puzzle, http://www.faseb.org/opa/mh/ (6 of 11)10/24/2005
- Rosenberg H, Pollock N, Schiemann H, Bulger T and Stowell K, Malignant hyperthermia: a review. Orphanet Journal of Rare Diseases (2015) 10: 93.
- Brunson DB, Hogan KJ, Malignant hyperthermia: a syndrome not a disease. Vet Clin Small Anim 34 (2004) 1419–1433.
- Brandom BW, Genetics of Malignant Hyperthermia. TheScientificWorldJournal 2206 (6): 1722-1730.
- Nelson TE, Jones EW and Anderson IL, Animal model: Porcine malignant hyperthermia. Am J Path 84,1 july 1976.
- Hopkins PM, Malignant hyperthermia: pharmacology of triggering. Br J Anaesth 2011;107(1):48–56.
- Carpenter D, Ringrose C, Leo V, Morris A, Robinson RL, Halsall PJ, et al. The role of CACNA1S in predisposition to malignant hyperthermia. BMC Med Genet. 2009; 10:104.
- Larach MG, Localio AR, Allen GC, Denborough MA, Ellis FR, Gronert GA, et al. A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. Anesthesiology, 1994;80(4):771–9.
- Ording H, Epidemiology of malignant hyperthermia. In: Schulte am Esch J, Scholz J,Wappler F, editors. Malignant hyperthermia. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2000. 26–9.
- Roberts MC, Mickelson JR, Patterson EE, et al. Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by a mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel. Anesthesiology 2001; 95:716–25.
- Berman MC, Harrison GG, Dutoit P, et al. Halothane induced hyperpyrexia in landrace pigs. S Afr Med J 1969; 43:545–6.
- Kirmayer AH, Klide AM, Puvance JE. Malignant hyperthermia in a dog: case report and review of the syndrome. J Am Vet Med Assoc 1984; 185:978–82.
- De Jong RH, Hoarner JE, Amory DW.Malignant hyperthermia in the cat. Anesthesiology 1974; 41:608–9.
- McClure JJ, Malignant hyperthermia in the horse: a case report. Minn Vet 1975;15(11):12–47.
- ClinVar-National center for Biotechnology Information, 2015
- Mickelson JR, Gallant EM, Litterer LA, et al. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. J Biol Chem 1988; 263:9310–5.
- Houde A, Pommier SA, Use of polymerase chain reaction technology to detect a mutation associated with malignant hyperthermia in different pig tissues. Meat Sci 1993; 33:349–58.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 1991; 253:448–51.
- Rosenberg H, Fletcher JE, An update on the malignant hyperthermia syndrome., Ann AcadMed Singapore 1994 23(sup 6):84-97.
- Litman RS, Flood CD, Kaplam R.F., Kim Y.L., Tobin J.R., Postoperative malignant hyperthermia an analysis of cases from the North American Malignant Hyperthermia registry. Anesthesiology, 2008 Nov; 109(5): 825-9
- Claxton-Gill MS, Cornick-Seahorn JL, Gamboa JC, Boatright BS, Suspected malignant hyperthermia syndrome in a miniature pot-bellied pig anesthetized with isoflurane. J Am Vet Med Ass. 1993 Nov 15; 203 (10):1434-6.
- Stowell KM, DNA testing for malignant hyperthermia: the reality and the dream. Anesth Analg. 2014, 118 (2):397-406.

- Bannister RA and Beam KG, Impaired gating of an L-type Ca2+ channel carrying a mutation linked to malignant hyperthermia. Biophys J. 2015 108(9): 2420.
- Jiang D, Chen W, Xiao J, Wang R, Kong H, Jones PP, Zhang L, Fruen B, Chen SR, Reduced threshold for luminal ca2+ activation of RYR1 underlines a causal mechanism of porcine malignant hyperthermia. J Biol Chem 2008; 283(30): 20813-30
- Manley SV, Kelly AB, Hodgson D, Malignant hyperthermia-like reactions in three anesthetized horses. J Am Vet Med Assoc, 1983 183(1): 85-9.
- Robinson RL, Anetseder MJ, Brancadoro V, van Broekhoven C, Carsana A,Censier K, et al. Recent advances in the diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility: how confident can we be of genetic testing? Eur J Hum Genet. 2003;11(4):342–8.
- Larach MG, Allen GC, Simon A. Safety and efficacy of Dantrolene Sodium for the Treatment of Malignant Hyperthermia Events. Anesthesiology. 1993;79: A1079.
- Fairhurst AS, Hamamoto V, Macri J. Modification of ryanodine toxicity by dantrolene and halothane in a model of malignant hyperthermia. Anesthesiology 1980;53(3):199–204.

IL SUINO NERO SICILIANO QUALE MODELLO COMPARATIVO PER LO STUDIO DELLA PSEUDOMELANOSI ACQUISITA NELL'UOMO

GIOVANNI LANTERI[1], FABIO MARINO[2]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina,
[2] Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali, Università degli Studi di Messina

Con il termine di "pigmentazioni patologiche" si identificano le deposizioni di sostanze con una propria colorazione nelle cellule e nei tessuti. I pigmenti di formazione endogena sono prodotti del metabolismo; la loro comparsa è il risultato di un disturbo metabolico. I pigmenti esogeni, invece, provengono dall'esterno e sono depositati nelle cellule e nei tessuti.

Le pigmentazioni di origine endogena sono causate da sostanze coloranti quali lipofuscina, melanina e dal gruppo degli emopigmenti, derivati dall'emoglobina (Dämmrich e Loppnow, 1986).

La più importante delle pigmentazioni di natura endogena è la melanosi, ovvero una pigmentazione grigio-nerastra degli organi dovuta all'accumulo di melanina (Zaghini *et al*., 1995).

La melanina (dal greco melas = nero), quale pigmento autoctono intracellulare, è caratterizzata dal colore bruno-nerastro; precipita con una soluzione ammoniacale di nitrato d'argento, l'argento metallico, e viene decolorata, per ossidazione, dall'acqua ossigenata (perossido d'idrogeno) e dal permanganato di potassio; questa proviene dai melanociti, che derivano dalla cresta neurale.

Tale sostanza è prodotta per ossidazione della tirosina, che rappresenta la base strutturale della sua molecola, da parte della tirosinasi (con apoenzima contenente rame) passando per desossifenilalanina (DOPA) e indolchinone. La melanina è elaborata da apposite cellule, i melanociti, i cui precursori - melanoblasti (non pigmentati) - derivano dalla cresta neurale (Dämmrich e Loppnow, 1986; Dianzani, 1995); questi ultimi possono cedere il pigmento ad altre cellule - melanofagi - capaci di immagazzinarlo e trasportarlo, ma non di sintetizzarlo (Dianzani, 1995).

La produzione di melanina, oltre che da fattori neuroendocrini, può essere influenzata da fattori esogeni (raggi X, arsenico, sostanze fenoliche, ecc.).

I fenoli, ad esempio, possono influenzare la polimerizzazione dei chinoni, derivanti dall'ossidazione dei fenoli, che assumono una colorazione scura (Marcato, 1987).

La melanina contenuta nei melanosomi viene assunta dalle cellule pigmentate dell'epidermide, dalla matrice dei capelli, dalla mucosa intestinale e dalla pia madre di determinati tratti del cervello (sostanza nigra) e nella coroide dell'occhio.

Alterazioni legate alla melanina possono verificarsi patologicamente o anormalmente come:
- alcune forme tumorali, quali il melanoma;
- melanosi;
- acanthosis nigricans;
- anomalie cutanee dell'uomo;
- iperpigmentazione cutanea associata a iperadrenocorticismo;
- nella rara malattia ereditaria dell'uomo nota come sindrome di Dubin-Johnson;
- nelle pecore mutanti Corredale, in cui un difetto escretorio di natura epatica provoca accumulo di pigmento melanico negli epatociti (Jones *et al*., 1997).

Le manifestazioni patologiche legate alla melanina possono dipendere da una perturbazione dei processi legati alla formazione o al trasporto e dispersione dei pigmenti (Marcato, 1987). La carenza di pigmenti può essere congenita o acquisita.

Come risultato di un'attività melanogenica in eccesso, a carattere malformativo congenito,

si riscontra una iperpigmentazione a focolai, definita melanosi maculosa (Marcato, 1987). Tale alterazione è caratterizzata dalla deposizione di melanina in vari organi spesso sotto forma di aree poligonali e irregolari di colore nero, nettamente delimitate, dal diametro uguale o maggiore a dieci centimetri, non provocanti alterazione della tessitura, della consistenza e della forma dei tessuti colpiti, e senza tendere alla trasformazione neoplastica (Marcato, 1987; Jones *et al*., 1997).

La melanosi compare spesso in vitelli, pecore e maiali, soprattutto in sede epatica, cardiaca, polmonare e nella pia madre del cervello, con tendenza a scomparire spontaneamente (Dämmrich e Loppnow, 1986; Marcato, 1987).

Nei suini è stata anche osservata una melanosi a macchie nel grasso sottocutaneo (Dämmrich e Loppnow, 1986); e ancora, nei suini a cute e/o mantello pigmentato, si può osservare una melanosi congenita del timo e del cervelletto con una incidenza del 36%, mentre in quelli a mantello non pigmentato la percentuale decresce in maniera elevata (0,25%) (Marcato, 2002).

La melanosis uberis è un'anomalia congenita e assai rara della ghiandola mammaria dei suini; il suo nome deriva dalla presenza di pigmento melanico nel tessuto adiposo e nel tessuto connettivale intorno ai dotti galattofori e agli alveoli mammari (Capucchio *et al*., 2000).

Le cellule che contengono melanina possono dare luogo a neoplasie benigne o melanoblastomi maligni, con un contenuto in pigmento molto variabile.

Una differenza fra i melanociti che sintetizzano melanina, da cellule tumorali e non, è possibile soltanto perché nei melanociti si può dimostrare per via istochimica la presenza di desossifenilalanina (reazione DOPA) (Dämmrich e Loppnow, 1986).

In generale, la melanosi rappresenta un riscontro insolito in sede di macellazione (Jones *et al*., 1997) e a oggi, tranne che nei solipedi, non risulta una patologia soggetta a denuncia e/o distruzione della carcassa.

Il Suino nero di Sicilia (Giannone, 2002) fa parte delle razze autoctone di colore nero presenti sul territorio italiano. Sin dall'epoca cartaginese (VIII-VI sec. a.C.) e greca, ma a seguire anche i Romani, se ne decantava la prelibatezza delle carni e dei prodotti da esse derivati (Chiofalo e Liotta, 2003). Tutt'oggi vive nelle zone più impervie dell'isola, all'interno dei boschi della catena montuosa dei Nebrodi e nei monti delle Madonie, conducendo un'esistenza assolutamente libera. Tradizionalmente allevato allo stato brado, condivide un territorio aspro e difficile con altre specie indigene e non (Matassino e Grasso, 1996). Tale suino deriva in origine da *Sus scrofa mediteraneus*, che diede origine a tutti i suini neri presenti nel sud dell'Europa e nel Nord-Africa; da questo suino discenderebbero inoltre, il suino iberico in Spagna, i suini del Nord-Africa e le altre razze di colore nero presenti in Italia.

Negli ultimi anni, il riscontro di un'aumentata incidenza di melanosi nella razza suina autoctona del Suino nero siciliano ha destato notevole interesse inducendo ad approfondire l'argomento.

Macroscopicamente, l'esame effettuato sui linfonodi non evidenzia alterazioni di forma e volume; l'unico aspetto saliente è rappresentato dalla marcata colorazione bruno-nerastra del tessuto che, in tutti i casi esaminati, interessa indistintamente corticale e midollare (fig 1)

Tenendo in debita considerazione l'habitat e il tipo di alimentazione di tali animali, sono state analizzate in laboratorio le ghiande di cui si alimentano. I risultati ottenuti dalla determinazione biochimica nei campioni di ghianda analizzati hanno messo in evidenza una quantità di 0,0137±0,012 mg di sostanze fenoliche.

I dati riportati rafforzano l'ipotesi relativa al fatto che l'ingestione di ghiande sia la causa di melanosi acquisita o pseudomelanosi (Lanteri *et al*., 2009; Lanteri *et al*., 2011). D'altronde già in passato questa ipotesi era stata riportata in letteratura quale possibile origine della melanosi in suini alimentati con ghiande (Carta, 1948) anche se, considerate le limitate cono-

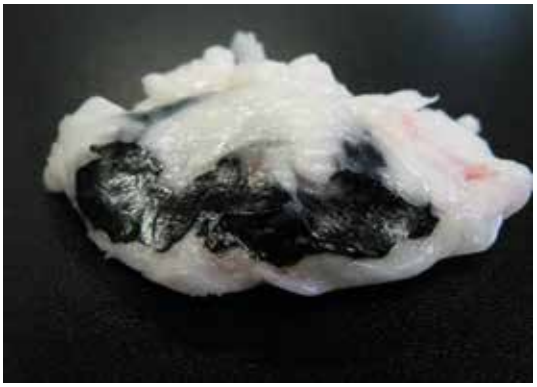


Fig. 1. L'esame istologico su sezioni di tessuto linfonodale ha permesso di evidenziare un infiltrato macrofagico contenente un pigmento brunastro di aspetto granulare (colorazione Ematossilina-Eosina)

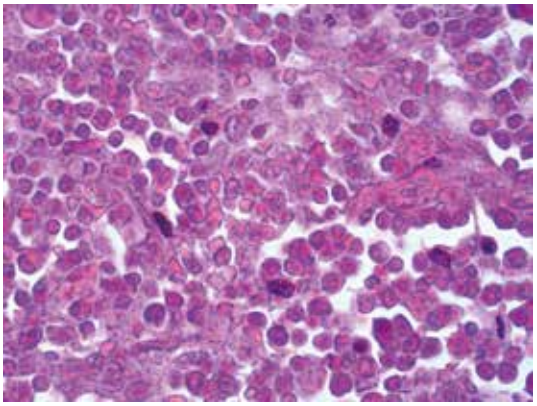


Fig. 2. La colorazione elettiva col Blue Nilo (idrogenosolfato) mostra un pigmento verde scuro, suggerendo così la presenza di un pigmento *melanin-like*

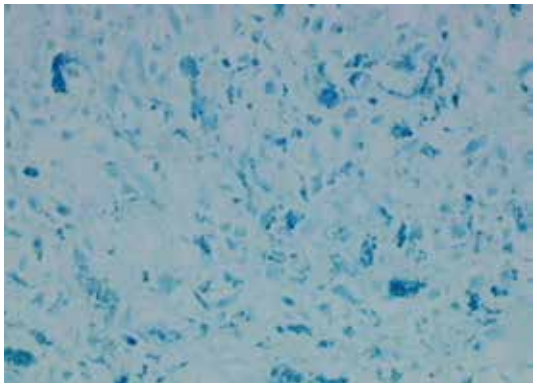


Fig. 3. Il metodo di Lillie al ferro-ferroso permette di evidenziare granuli di colorito verde-blu scuro all'interno di strutture macrofagiche, fornendo ulteriore e definitiva conferma della diagnosi

scenze scientifiche e tecniche del tempo, si ipotizzavano i tannini quale causa scatenante, ma non veniva fornita alcuna dimostrazione.

Possiamo quindi affermare che le polifenolossidasi e/o le perossidasi presenti a livello intestinale nel suino potrebbero attivare il substrato fenolico presente nella ghianda, deter-

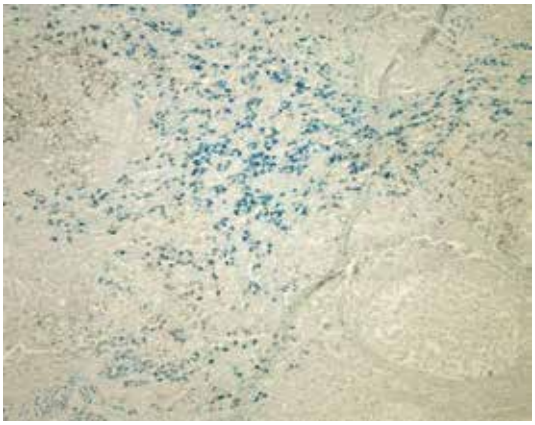


Fig. 4. I due test istochimici decoloranti e specifici (Melanin Bleach e Perossido di Idrogeno per 24 ore) mettono in risalto la totale scomparsa del pigmento.

Fig. 5. La reazione di Okun, effettuata su sezioni criostatate di tessuto intestinale, mostra la formazione di pigmento melaninico intracellulare in mastociti confermando la presenza dell'enzima tirosinasi.

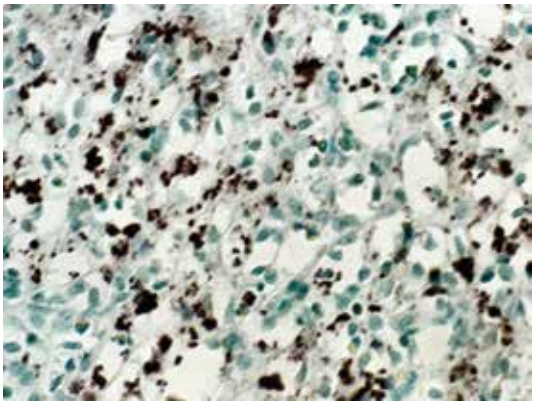


Fig. 6. La reazione immunoistochimica Macrophage marker, effettuata su sezioni di tessuto linfonodale, mette in evidenza diversi macrofagi contenenti variabili quantità di granuli di pigmento

minando la reazione di catalisi del pigmento melanin-like. D'altronde, anche Wilberts *et al*. (2014) hanno riportato la presenza di una melanosis coli nel suino da accumulo di pigmento ceroide a eziologia multifattoriale, studiando l'associazione tra danno ossidativo, nitrazione delle proteine e ipovitaminosi E.

Istologicamente, la melanosis coli è caratterizzata da accumuli di macrofagi carichi di pigmento nella lamina propria della mucosa colon-rettale (Ghadially e Walley, 1994). Recenti indagini di laboratorio hanno evidenziato che la composizione di tale pigmento non è perfettamente sovrapponibile con il pigmento melaninico (Freeman, 2008); di conseguenza, è stato introdotto il termine *pseudomelanosi,* che suggerisce la presenza di un pigmento melanin-like di natura esogena.

Nell'uomo, la melanosis coli è caratterizzata da una pigmentazione marrone-nerastra della mucosa del colon ed è comunemente associata con l'uso cronico di lassativi a base di antracene (tra cui la cascara, senna, aloe e rabarbaro), che contengono antrachinone quale principio attivo.

Il termine melanosis coli è stato coniato nel 1857 dal patologo tedesco Rudolf Virchow, il quale descrisse un pigmento nerastro a livello colico, anche se, anni prima, Cruveilhier aveva già descritto una colorazione nerastra "tipo inchiostro di china" sulla superficie interna del grosso intestino. Nel campo della patologia comparata è stato riportato che l'uso cronico di lassativi vegetali a lungo termine a base di antrachinonici nell'uomo provoca la comparsa di melanosi del colon (Oteri, 2007).

Concludendo, le caratteristiche di rusticità del Suino nero siciliano, ormai allevato con sistema *plein-air,* ne fanno un interessante modello in vivo per lo studio di alcune patologie scomparse o diventate ormai rare nella moderna suinicoltura, tanto da poterlo considerare modello di studio comparativo anche per alcune patologie umane.

Bibliografia

- Capucchio M. T., Guarda F., Griglio B. (2000). Melanosis uberis: un insolito reperto di macellazione nel suino. Large Animal Review, Anno 6, n. 3, pp 53-54.
- Carta A. (1948). Sulla pseudomelanosi dei linfonodi di suini alimentati con ghiande. Atti Soc. Ital. Scienze Vet., vol. II, pp 363-369.
- Chiofalo L., Liotta L. (2003). Suino nero, una perla in terra siciliana. Riv. Suinicoltura, Anno XLIV, n. 10, 86.
- Dämmrich K., Loppnow H. (1986): Modificazioni regressive. In: Stünzi H., Weiss E. (1986): Patologia Generale Veterinaria. Edizione italiana a cura di F. Guarda, Editoriali Grasso, pp 244-245.
- Dianzani M. U. (1995). Istituzioni di Patologia Generale. Ed. UTET, pp 418.
- Freeman HJ. (2008). ''Melanosis'' in the small and large intestine. World J Gastroenterol, 14:4296–4299.
- Ghadially FN, Walley VM. (1994). Melanoses of the gastrointestinal tract. Histopathology, 25:197–207.
- Giannone M. (2002) Una "perla nera" in terra siciliana. Rivista di suinicoltura, 43(3), 2002, pp. 75 – 78.
- Jones T. C., Hunt R. D., King N. W. (1997). Mineral deposits and pigments. In: Jones T. C., Hunt R. D., King N. W. (1997), Veterinary Pathology (1997), 6th Ed., London, Williams and Wilkins, pp 66-67.
- Lanteri G., Marino F., Laganà G., Bellocco E., Barreca D., Liotta L., Sfacteria A., Macrì B. (2009). Acquired melanosis caused by acorn ingestion in the Nero Siciliano Pig. Vet. Pathol., 46:329-333.
- Lanteri G., Marino F., Liotta L., De Stefano C., Macrì B. (2011). Experimentally induced melanin-like pigmentation (thesaurismosis) related to acorn ingestion in nero siciliano pigs. Acta Veterinaria Hungarica, 59 (3), pp. 311-318
- Marcato P.S. (1987). Anatomia e Istologia Patologica Veterinaria. Ed. Esculapio, pp 135-139.
- Marcato P.S. (2002). Patologia Sistematica Veterinaria. Ed. Edagricole, pp 265-266.
- Matassino D., Grasso F. (1996). Salvate quei suini, sono autoctoni. Suinicoltura, (10), 69
- Oteri A. 2007. L'utilizzo della fitoterapia. Utifar, Nuovo Collegamento, agosto-settembre 2007, pp 36-38.
- Zaghini L., Della Salda L., Marcato P. S., 1995. Melanosi e melanomi nei suini macellati. Documenti veterinari, 1995. n° 2, pp 55-62.
- Wilberts BL, Schwartz KJ, Gauger PC, Wang C, Burrough ER. 2014. Evidence of Oxidative Injury in Pigs With Melanosis Coli. Veterinary Pathology, 1-5.

MODELLI ANIMALI PER LO STUDIO DELLA NEURODEGENERAZIONE E DELLA NEUROPATOLOGIA DELL'INVECCHIAMENTO

MARIA TERESA CAPUCCHIO, ILARIA BIASATO, ELENA BIASIBETTI

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino.

L'invecchiamento determina progressivo e graduale deterioramento delle funzioni tissutali e dell'omeostasi. La gravità del deterioramento correlato all'età varia notevolmente nei diversi individui e nei tessuti (Glass *et al*., 2013; Melis *et al*., 2013). L'encefalo è probabilmente il tessuto più sensibile per la sua alta richiesta di ossigeno, la scarsa capacità di sintesi di antiossidanti e la limitata capacità rigenerativa (Dror *et al*., 2014). L'invecchiamento cerebrale non è solo associato con cambiamenti morfologici e biomolecolari, ma porta anche ad alterazioni cognitive e comportamentali. I disordini cognitivi sono anche riportati in medicina veterinaria nel cane e recentemente nel gatto, anche se la correlazione con le lesioni neurologiche legate all'invecchiamento non è stata completamente chiarita.

In medicina umana le disfunzioni cognitive osservate più comunemente sono la demenza ovvero la perdita di memoria e i disturbi comportamentali, e le alterazioni delle funzioni normali (Roth *et al*., 1986). La più comune forma di demenza umana è la malattia di Alzheimer (AD) caratterizzata da due elementi istologici chiave: i depositi extracellulari di beta-amiloide (Aβ) circondati da neuriti distrofici e le placche neurofibrillari (NFT) intraneuronali (Iqbal *et al*., 2002; Serrano Pozo *et al*., 2011). Queste lesioni compromettono l'omeostasi neuronale determinando disfunzioni cognitive.

In medicina veterinaria si parla di disfunzione cognitiva quando si osserva deterioramento delle abilità cognitive. I cani anziani sono la specie animale in cui queste alterazioni sono più comunemente descritte e pertanto vengono considerati un buon modello per studiare il declino cognitivo e caratterizzare le placche amiloidi. Placche di Aβ possono essere osservate in cani clinicamente sani ma, analogamente all'uomo, il loro incremento in questa specie è positivamente correlato con le turbe cognitive (Cummings *et al*., 1996; Colle *et al*., 2000; Landsberg *et al*., 2012). I cani possono sviluppare anche angiopatia cerebrale amiloide, ma non presentano NFT (Yu *et al*., 2011; Bosh *et al*., 2012; Vite e Head, 2014). Comunque, se molti cani anziani mostrano un caratteristico declino delle capacità cognitive (memoria, funzioni esecutive), alcuni restano normali senza visibili alterazioni (Milgram *et al*., 1994).

Disfunzioni cognitive sono state identificate di recente nel gatto e sembrano coinvolgere circa il 28% dei gatti di età compresa tra 11 e i 14 anni e oltre il 50% dei gatti oltre i 15 anni (Gunn-Moore *et al*., 2007). I segni clinici tipici sono il disorientamento, le alterate interazioni con i proprietari e gli altri gatti, i disturbi del ciclo sonno-veglia, i cambiamenti di attività, l'ansietà e i deficit di apprendimento e memoria (Landsberg *et al*., 2012). Tra le comuni lesioni si osservano atrofia cerebrale, placche di Aβ e NFT (Head *et al*., 2005; Gunn-Moore *et al*., 2007; Gunn-Moore, 2011). Comunque l'associazione tra queste lesioni e i disturbi cognitivi non è stata ben definita, in quanto tali lesioni sono anche presenti in gatti normali.

Alterazioni cognitive o comportamentali non sono sinora state descritte nei cavalli anziani o perlomeno non è stata stabilita una correlazione tra le anomalie comportamentali e l'invecchiamento (Youssef *et al*., 2016).

Alcuni animali sviluppano quindi lesioni encefaliche analoghe a quelle che si osserva-

no nelle malattie neurodegenerative dell'uomo, in particolare l'AD e il morbo di Parkinson (PD), ma mancano studi dettagliati sulla patogenesi delle lesioni. Per quanto riguarda l'AD i potenziali modelli animali dovrebbero sviluppare i due elementi istologici chiave di questa malattia neurodegenerativa, ovvero i depositi di Aβ e le NFT. Purtroppo però nessun modello animale spontaneo rispetta i due requisiti sopra riportati e per questo motivo si utilizzano come modelli i roditori transgenici. Si osservano infatti deposizioni amiloidi, ma assenza di aggregati neurofibrillari, in scimmie e cane (Youssef *et al*., 2016). La spiegazione di questo fenomeno è stata attribuita alla lunghezza della vita in queste specie animali (teoria della velocità dell'invecchiamento cerebrale): se la durata della vita in questi animali potesse essere allungata considerevolmente, probabilmente si svilupperebbero le NFT (Youssef *et al*., 2016). Recentemente le NFT sono stati descritte nei gatti ed in altri felidi (Chambers *et al*., 2012; Castro-Fuentes e Socas-Perez, 2013; Tarragon *et al*., 2013), osservazione che non trova spiegazione con la teoria suddetta. Pertanto si ipotizza che l'aggregazione di Aβ e la fosforilazione di tau possano dipendere dalle differenze di specie presenti nella sequenza aminoacidica della regione N terminale della molecola di Aβ (Youssef *et al*., 2016).

Per quanto riguarda il PD, la lesione istologica caratteristica è data dallo sviluppo di inclusioni citoplasmatiche chiamate corpi di Lewy, composte da sinucleina fosforilata nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra* che vanno incontro a progressiva riduzione numerica. Non vi sono malattie spontanee in medicina veterinaria identiche al PD (Youssef *et al*., 2016). Il cane non mostra variazioni dei neuroni della *substantia nigra* con l'età, nè corpi di Lewy (Youssef *et al*., 2016). Anche nei gatti anziani non sono mai stati descritti i corpi di Lewy; il numero dei neuroni dopaminergici aumenta con l'età ma non in modo significativo, e l'accumulo ha una differente localizzazione cellulare (Youssef *et al*., 2016). Si è visto inoltre che somministrando l'1metil-4fenil-1,2,3,6 tetraidropiridina, un oppioide, si può indurre i segni clinici del PD perché vengono danneggiati i neuroni dopaminergici con riduzione della dopamina (Xe e Nakayama, 2009). Non si osservano tuttavia i corpi di Lewy. Anche la somministrazione dell'insetticida rotenone (Betarbet *et al*., 2000) o di erbicidi quali il paraquat/maneb o la 6 idrossidopamina a ratti e topi (Betarbet *et al*., 2002) può indurre una sintomatologia clinica analoga al PD con aggregati di sinucleina nei neuroni dopaminergici, senza però spiegare il meccanismo patogenetico della malattia umana.

Lesioni encefaliche correlate all'invecchiamento

Lesioni neuronali. Numerose lesioni neuronali sono descritte nell'uomo e negli animali associate all'invecchiamento, alcune delle quali considerate patognomoniche di malattie neurodegenerative umane. Una delle più comuni è la *perdita neuronale* che consegue a processi necrotici o apoptotici per danni mitocondriali o al reticolo endoplasmatico, o a disturbi del sistema autofagico (Ghavami *et al*., 2014). Gravi fenomeni di perdita neuronale portano a riduzione della densità neuronale e quindi ad atrofia encefalica. Per *atrofia encefalica* si intende la graduale riduzione del volume encefalico dopo il raggiungimento delle dimensioni adulte. E' descritta in cani, gatti, scimmie e uomo (Serrano-Pozo *et al*., 2011; Landsberg *et al*., 2012; Cheng *et al*., 2013). Macroscopicamente l'encefalo atrofico è caratterizzato da riduzione di peso e volume e talvolta da decolorazione corticale. Le meningi sono di solito ispessite per fibrosi e mineralizzazioni e in parte aderenti alla scatola cranica. Le circonvoluzioni sono appiattite e i *sulci* poco profondi. I ventricoli sono dilatati per *idrocefalo ex vacuo* (Maxie e Youssef, 2007*)*. Non sono colpite in ugual modo tutte le aree corticali, ma alcune zone mostrano atrofia più grave e più precoce (corteccia prefrontale rispetto ippocampo) (Tapp *et al*., 2004). Diversi meccanismi sembrano contribuire all'atrofia, sicuramente la perdita dei neuroni o il loro raggrinzimento (West *et al*., 1993; Bobinski *et al*., 1997; Simic *et al*., 1997). La

perdita neuronale è particolarmente evidente nel giro dentato dell'ippocampo, nel cervelletto (cellule di Purkinje) e nei nuclei del *locus coeruleus* (Pugliese *et al*., 2007; Siwak-Tapp *et al*., 2008; Insua *et al*., 2010). Queste riduzioni neuronali sono state associate a alterazioni cognitive. Nei gatti anziani sono state osservate significative riduzioni del numero dei neuroni dell'ippocampo successive ad accumuli di proteina tau altamente fosforilata (Youssef *et al*., 2016). La perdita delle cellule ippocampali nel cane sembra possa anche essere esacerbata da una ridotta neurogenesi e sostituzione dei neuroni persi (Hwang *et al*., 2007; Siwak-Tapp *et al*., 2007; Pekcec *et al*., 2008). Le p*lacche neurofibrillari (NFT) s*i formano per deposito intraneuronale di proteina tau insolubile iperfosforilata e aggregata in modo anomalo con conseguente degenerazione neuronale (Uchihara *et al*., 2001; Iqbal e Grundke-Iqbal, 2008). Dopo la morte del neurone le NFT residuano nel neuropilo e diventano extraneuronali. Esse possono essere osservate con colorazioni argentiche, tioflavina S o anticorpi specifici per la proteina tau, una proteina associata ai microtubuli per mediare il trasporto assonale (Uchihara *et al*., 2001). Nell'AD la proteina tau va incontro a iperfosforilazione, ubiquitinazione e mal aggregazione in filamenti a elica appaiati (Morishima-Kawashima *et al*., 1993). Tali filamenti così aggregati sono neurotossici e interferiscono con l'omeostasi cellulare e il sistema di trasporto assonale (Bancher *et al*., 1991; Matsuo *et al*., 1994). NFT analoghe all'AD non sono state descritte nel cane (Selkoe *et al*., 1987; Russel *et al*., 1992); sono invece presenti iperfosforilazioni della proteina tau analoghe all'uomo con AD (Kuroki *et al*., 1997; Wegiel *et al*., 1998; Papaioannou *et al*., 2001; Head *et al*., 2005; Yu *et al*., 2011). Questa mancanza di NFT nel cane potrebbe dipendere da differenze tra la sequenza aminoacidica della proteina tau dell'uomo e dei cani (Youssef *et al*., 2016). Sono stati descritti accumuli di tau iperfosforilata anche in felidi (gatti, leopardi, ghepardi) (Head *et al*., 2005; Gunn-Moore *et al*., 2006; Gunn-Moore *et al*., 2007; Serizawa *et al*., 2012), ovi-caprini (Braak *et al*., 1994; Nelson *et al*., 1994), scimmie, bisonti e orsi (Cork *et al*., 1988; Roertgen *et al*., 1996; Schultz *et al*., 2000a; Schultz *et al*., 2000b; Hartig *et al*., 2001; Oikawa *et al*., 2010); si tratta di accumuli sporadici e di norma non associati con perdita neuronale o presenza di NFT (Gotz e Ittner, 2008). Possono anche precedere l'accumulo di Aβ o essere associati (Hardy e Selkoe, 2002; Braak e Del Tredici, 2011; Jack *et al*., 2013). Nei cavalli anziani un unico lavoro (Capucchio *et al*., 2010) mostra come sporadici neuroni ippocampali siano positivi per la proteina tau (fig. 1A), ma negativi per la tau iperfosforilata e non siano presenti NFT, forse per alterazioni del trasporto assonale nell'ippocampo. Tra gli a*ccumuli di pigmento*, la lipofuscina è il più importante; si tratta di un pigmento giallastro osservato nelle cellule post-mitotiche quali neuroni o cardiomiociti. La lipofuscina ceroide è un pigmento similare osservato soprattutto nei fagociti. La lipofuscina è considerata un pigmento legato all'invecchiamento indipendente dalle alterazioni morfologiche cellulari (Porta, 2002; Sulzer *et al*., 2008). La si osserva già in animali giovani, anche se limitata a grossi neuroni, ma aumenta quantitativamente e diventa diffusa con l'età (Oenzil *et al*., 1994; Liang *et al*., 2004; Sulzer *et al*., 2008). La sua eventuale correlazione con la morte neuronale resta da chiarire, mentre invece gli accumuli di lipofuscina ceroide causano malattie neurodegenerative progressive letali note come lipofuscinosi ceroide, tra le malattie ereditarie lisosomiali descritte in medicina umana e veterinaria (Summers *et al*., 1995). Gli accumuli di lipofuscina sono molto comuni nel cavallo anziano, dove però non sembrano indurre lesioni degenerative (Jahns *et al*., 2006; Capucchio *et al*., 2010) (fig. 1B); si repertano nei primati non umani, nel gatto e nel bovino (Boellaard *et al*., 2004; Marquez *et al*., 2008). La neuromelanina è un pigmento brunastro, polimero organico prodotto nel corso del metabolismo della dopamina. La si osserva aumentare soprattutto nei neuroni della *substrantia nigra* e nei pinealociti (fig. 1C) in varie specie animali e nell'uomo (De Mattei *et al*., 1986; Capucchio *et al*., 2010; Wohlsein *et al*., 2012). In medicina umana diminuisce marcatamente nei pazienti affetti da morbo di Parkinson (PD) (Secca *et al*., 2002;

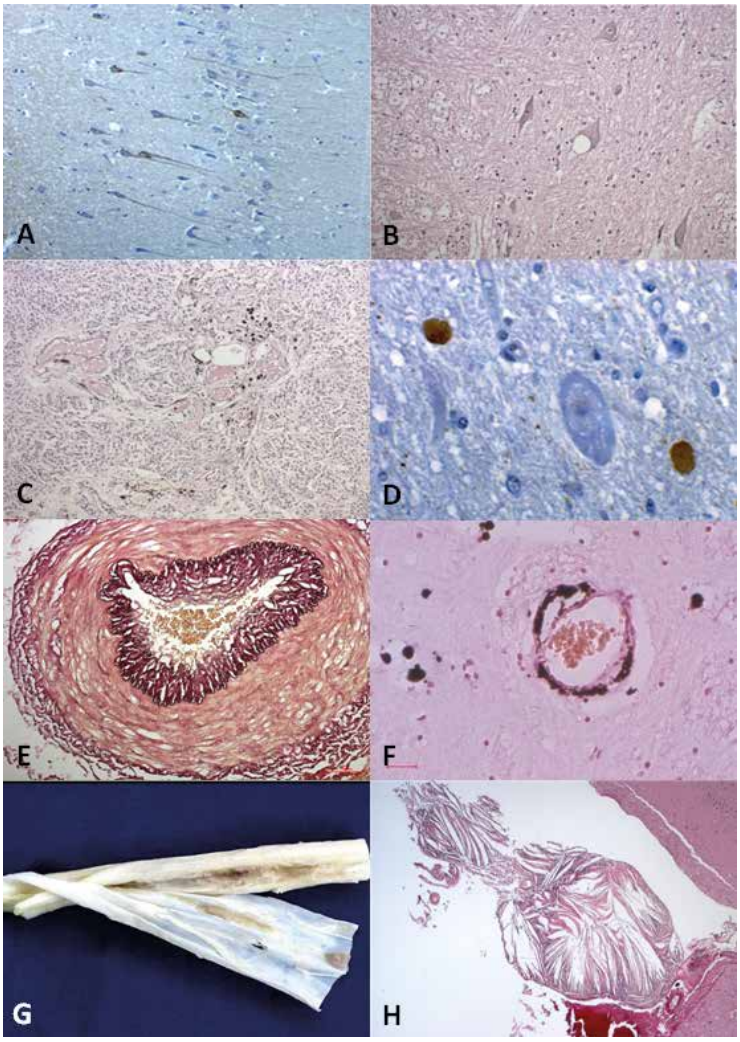


Fig. 1. A. Cavallo. Encefalo. Neuroni ippocampali positivi per Tau 3R (colorazione immunoistochimica e contro-colorazione con Ematossilina; medio ingr.) (Capucchio *et al*., 2010). B. Cavallo. Encefalo. Ponte: un neurone con vacuoli citoplasmatici; accumuli di lipofuscina in multifocali pericari neuronali (colorazione Ematossilina-Eosina; medio ingr.) (Capucchio *et al*., 2010). C. Cavallo. Epifisi. Multifocali accumuli di neuro melanina (colorazione Ematossilina-Eosina, piccolo ingr.). D. Cavallo. Encefalo. Assoni sferoidi positivi per ubiquitina (colorazione immunoistochimica e contro-colorazione con Ematossilina; forte ingr.) (Capucchio *et al*., 2010). E. Cavallo. Encefalo. Degenerazione vascolare di un'arteriola meningea: proliferazione intimale; iperplasia, ipertrofia e vacuolizzazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media (colorazione Weigert Van Gieson; medio ingr.). F. Cavallo. Encefalo. Capsula interna. Mineralizzazioni vascolari e nel neuropilo (colorazione Ematossilin-Eosina; forte ingr.). G. Cane. Midollo spinale. Multifocali placche ossificate adese alle meningi ventrali. H. Cavallo. Encefalo. Granuloma colesterinico (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.) (Capucchio *et al*., 2010).

Sulzer *et al*., 2008). Nei cani il numero dei neuroni con accumuli aumenta con l'età (Uchida *et al*., 2003), tuttavia in medicina veterinaria il significato della neuromelanina in relazione all'invecchiamento non è stato chiarito. La d*egenerazione neuronale granulovacuolare*, soprattutto nell'ippocampo, è un altro reperto istologico caratteristico dell'invecchiamento dell'uomo e in particolare dell'AD (Tomlinson e Tchenerg, 1972; Serrano-Pozo *et al*., 2011). I granuli hanno una composizione molto varia, che comprende proteine dei neurofilamenti, ubiquitina, tau fosforilata e altre proteine associate ai microtubuli (Yamazaki *et al*., 2011). Non sono mai stati descritti e caratterizzati analoghi accumuli in medicina veterinaria. *Vacuolizzazioni neuronali* sono state segnalate in gatti (Vite e Head, 2014), bovini (Gavier-Widen *et al*., 2001) e cavalli anziani (Capucchio *et al*., 2010) (fig. 1B), anche se la correlazione di queste lesioni con l'invecchiamento non è stata del tutto chiarita. Numerose *inclusioni citoplasmatiche* sono state riportate nel cervello degli animali anziani (in particolare cani) o con patologie neurodegenerative (Summers *et al*., 1995). Si tratta soprattutto di inclusioni eosinofiliche simili a corpi del Negri o inclusi basofili amorfi molto diversi dai corpi di Lewy descritti nei pazienti con PD (Uchida *et al*., 2003). Altri inclusi intracitoplasmatici sono stati repertati nei motoneuroni di soggetti con sclerosi laterale amiotrofica o con demenza frontotemporale della malattia di Pick, molti dei quali immunopositivi per cistatina C, ubiquitina, tau iperfosforilata e/o TDP-43 (Neumann *et al*., 2006; Okamoto *et al*., 2008; Blokhuis *et al*., 2013). Inclusi simili sono stati trovati in cavalli con malattia dei motoneuroni e cani con mielopatia degenerativa (Maxie e Youssef, 2007; Summers *et al*., 1995). Il significato di queste inclusioni e la loro relazione con la degenerazione dei neuroni resta comunque da chiarire.

Lesioni del neuropilo. Le *placche amiloidi* sono formate da accumuli di Aβ, peptidi di varia dimensione derivanti dal clivaggio enzimatico di una proteina di membrana detta APP (Amyloid Precursor Protein) prodotta dai neuroni e da altre cellule del cervello ma espressa anche in tessuti extraneurali, la cui funzione è sconosciuta (Catricala *et al*., 2012). Le placche sono neurotossiche e si accumulano soprattutto nella neocortex e in misura leggermente minore in allocortex, gangli della base, alcuni nuclei del tronco encefalico e cervelletto (Nelson *et al*., 2009; Serrano-Pozo *et al*., 2011). La neurotossicità non è però costante, ma sembra dipendere dalla conformazione e dall'assemblaggio dei peptidi. Istologicamente le placche sono state distinte in due tipologie: mature o neuritiche (associate a degenerazione/distrofia dei neuroni, a neuriti con accumuli di tau iperfosforilata e reattività gliale) e diffuse o amorfe (extracellulari, non specifiche dell'AD e non associate a reazione gliale o neuronale). Accumuli di Aβ sono stati osservati negli encefali di volatili, primati, carnivori, orsi e altre specie (Selkoe *et al*., 1987; Nakamura *et al*., 1995; Uchida *et al*., 1995; Ronald *et al*., 2009; Vite *et al*., 2014). Nei cani si tratta soprattutto di placche diffuse, mentre le forme mature sono rare. Sono presenti dagli 8 anni e coinvolgono circa il 50% dei cani oltre i 15 anni di età (Youssef *et al*., 2016). Hanno sede in particolare nella corteccia prefrontale ed entorinale analogamente all'uomo e contengono peptidi con la stessa sequenza aminoacidica (Johnstone *et al*., 1991). Sembrano correlate con il declino delle capacità cognitive come nell'uomo (Head *et al*., 2000). Molti felidi mostrano anche placche amiloidi, ma sono diverse da quelle osservate in medicina umana (Head *et al*., 2005; Gunn-Moore *et al*., 2007; Chambers *et al*., 2012; Vite *et al*., 2014). Nel gatto sono peptidi tronchi con sequenza aminoacidica leggermente diversa, che potrebbe spiegare la più debole aggregazione (Head *et al*., 2005; Chambers *et al*., 2012). Placche diffuse colorate con metodi istochimici sono state osservate nei cavalli, anche se sono negative immunologicamente con l'impiego di anticorpi specifici per Aβ (Capucchio *et al*., 2010). *Poliglucosani* ovvero accumuli proteici sono osservati sia in forme neurodegenerative (Lafora disease nei neuroni) sia in individui anziani. Con l'invecchiamento si osservano corpi sferici PAS positivi generalmente nelle cellule gliali (astrociti) senza apparente associazione

con turbe funzionali. In medicina veterinaria, viste le incertezze sul loro significato e sulla localizzazione (gliale o neuronale), la descrizione dei poliglucosani è ancora molto dubbia. Sono stati osservati in molti animali anziani (Suzuki *et al*., 1980; Uchida *et al*., 1995; Cavanagh, 1999), anche se frequenza e distribuzione sono più noti nel cane. In questa specie aumentano con l'età e prevalgono nel diencefalo nei pericari e nel neuropilo (Suzuki *et al*., 1978; Youssef *et al*., 2016). La formazione degli *sferoidi* è la caratteristica lesione legata alla distrofia assonale. Gli sferoidi possono essere associati a forme neurodegenerative, ma aumentano anche con l'età senza comportare segni neurologici (Suzuki e Suu, 1978). Nei cani anziani si osservano soprattutto nel tronco encefalico e nel midollo spinale, e sono spesso osservati insieme a granuli ubiquitina positivi (Youssef *et al*., 2016). Analoghi sferoidi ubiquitina positivi sono stati repertati nei cavalli anziani soprattutto nel mesencefalo e nel corpo striato, indicando la presenza di fenomeni proteolitici il cui significato resta da chiarire (Capucchio *et al*., 2010) (fig. 1D). *Atrofia della sostanza bianca* cerebrale e accumuli di macrofagi perivascolari con lipofuscina all'interno sono anche stati riscontrati in cani anziani (Chambers *et al*., 2012). Inoltre depositi di Aβ e apolipoproteina E intorno a capillari spesso occlusi sono stati descritti ipotizzando fenomeni di danno ossidativo alla sostanza bianca con degenerazione assonale e mielinica, analogamente a quanto accade in medicina umana in certe forme di demenza soprattutto su base vascolare (Head *et al*., 2002; Chambers *et al*., 2012).

Lesioni vascolari. L'*angiopatia cerebrovascolare amiloide* si osserva comunemente in umana soprattutto nei pazienti con AD (Attems *et al*., 2005; Serrano-Pozo *et al*., 2011). Coinvolge in particolare le aree occipitali posteriori e parietali e capillari e piccole arterie della sostanza grigia delle meningi (Serrano-Pozo *et al*., 2011). E' una lesione molto comune nei cani anziani che colpisce fino al 100% degli animali oltre i 13 anni determinando parte dei segni clinici delle disfunzioni cognitive (Wegiel *et al*., 1995; Walker *et al*., 1997). La corteccia occipitale anche nel cane è la più coinvolta. Le pareti vasali con depositi di Aβ sono più fragili e pertanto microemorragie sono più frequenti (Uchida *et al*., 1990; Uchida *et al*., 1991). Nonostante il riscontro di danni di barriera associati, non ci sono studi dettagliati in merito ad aumento di fenomeni infiammatori o alterazioni dell'integrità mielinica in associazione alla presenza di vasi con questa angiopatia (Shimada *et al*., 1992; Morita *et al*., 2005; Pugliese *et al*., 2006; Pugliese *et al*., 2007; Chambers *et al*., 2012). Il cane tuttavia sembra costituire un ottimo modello spontaneo per lo studio di questi processi degenerativi vascolari. Accumuli vascolari di Aβ sono anche stati descritti nei gatti anziani (Vite e Head, 2014) e nei primati non umani (Summers *et al*., 1995; Nakamura *et al*., 1995); non sono sinora stati riportati nei cavalli. Il loro significato in queste ultime specie resta ancora da stabilire. Fenomeni di *aterosclerosi* sono molto rari in medicina veterinaria e non sono mai state osservate placche ateromasiche analoghe a quelle presenti nell'uomo. Fenomeni di *arteriosclerosi* con processi degenerativi della tonaca media, seguiti da proliferazioni dell'intima e/o della media sono molto più comuni, anche se non sembrano associati a gravi ripercussioni sul flusso ematico. Processi degenerativi dei vasi arteriosi meningei sono stati descritti nei cavalli anziani (Capucchio *et al*., 2010) (fig. 1E), nei suini e nei bovini adulti (Youssef *et al*., 2016), ma il loro significato resta da chiarire. Le *mineralizzazioni vascolari* sono ampiamente descritte in medicina umana (Lowe *et al*., 1997), ma anche in scimmie (Yanai *et al*., 1994), bovini (Yanai *et al*., 1994), topi (Yanai *et al*., 1987), ratti (Yanai *et al*., 1993), gatti (Mandara, 2003), cani (Fankhauser *et al*., 1965) e cavalli (Yanai *et al*., 1986; Capucchio *et al*., 2010; Martinez *et al*., 2012) (fig. 1F). Il loro significato clinico e la patogenesi restano tuttavia sconosciuti. Sono considerati per lo più reperti accidentali, anche se ci sono segnalazioni di occlusioni vascolari con segni neurologici e aree di necrosi con neoformazione vasale (Yanai *et al*., 1996; Jahns *et al*., 2006; Capucchio *et al*., 2010; Martinez *et al*., 2012). Le mineralizzazioni posso-

no coinvolgere tutti i tipi di vasi sanguigni, anche se sono più frequenti a livello di arteriole. Sono composte per lo più da calcio e fosforo con minor quantità di magnesio e altri minerali associati a mucopolisaccaridi che le rendono PAS positive (Morgan *et al*., 1982; Yanai *et al*., 1994; Capucchio *et al*., 2010). Aumentano con l'età nei cavalli (Capucchio *et al*., 2010). In cavalli e bovini si trovano soprattutto nel corpo striato, nel talamo e nel cervelletto (Capucchio *et al*., 2010; Martinez *et al*., 2012).

Lesioni meningee. La *fibrosi* meningea soprattutto a livello della superficie dorsale del cervello è molto comune negli animali anziani, descritta in particolare in cani (Summers *et al*., 1995; Borras *et al*., 1999), gatti (Ozsoy e Haziroglu, 2010) e cavalli (Summers *et al*., 1995). Può anche essere associata a mineralizzazioni, anche se non sembra tuttavia avere un significato clinico. *Placche di metaplasia ossea* dorsali o ventrali sono occasionali a livello di dura madre spinale nei cani anziani soprattutto nei tratti cervicale e lombare (von Sandersleben *et al*., 1966; Roynard *et al*., 2012) (fig. 1G). Sono considerate reperti necroscopici occasionali, anche se ci sono alcuni lavori in cui sono state associate allo sviluppo di segni clinici (Mandara, 2003; Lorenz e Kornegay, 2004). Antila *et al*. (2013) hanno descritto placche ossee spinali anche in un gatto di 6 anni. La loro eziologia resta sconosciuta, benchè si ipotizzi siano secondarie a irritazioni meccaniche locali. *Granulomi di colesterolo* sono tipiche lesioni intracraniche riportate in cavalli anziani (fig. 1H), pecore, gatti, cani, rettili e anfibi (Summers *et al*., 1995; Maxie e Youssef, 2007; Capucchio *et al*., 2010). Sono descritti in sede meningea, nei plessi corioidei e raramente in altre sedi del parenchima cerebrale. Anche in questo caso sono per lo più reperti accidentali benché siano stati osservati deficit neurologici associati (Lovett *et al*., 2012; Tofflemire *et al*., 2013).

Lesioni gliali. *Astrocitosi e microgliosi* non associate a flogosi, neurodegenerazione o neoplasie sono state descritte in bovini (Gavier-Widen *et al*., 2001), cani (Borras *et al*., 1999; Vite e Head, 2014) e cavalli anziani (Capucchio *et al*., 2010). Foci di *satellitosi* sono anche stati descritti nei cervelli dei cavalli anziani (Capucchio *et al*., 2010), soprattutto nella corteccia frontale, nel talamo e nel mesencefalo. Il loro significato e la loro associazione con l'invecchiamento restano però da chiarire.

Bibliografia

- Antila JM, Jeserevics J, Rakauskas M, Anttila M, Cizinauskas S. Spinal dural ossification causing neurological signs in a cat. Acta Veterinaria Scandinavica. 2013;55:47–52.
- Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. Acta Neuropathol. 2005;110:345–359.
- Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Fried VA, Smith HT, Wisniewski HM. Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. Brain Res. 1991;539:11–18.
- Betarbet R, Sherer T, Greenamyre JT. Animal model of Parkinson's disease. BioEssays. 2002;24:308–318.
- Betarbet R, Sherer T, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pestiside exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nat Neurosci. 2000;3:1301–1306.
- Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. 2013;125(6): 777–794.
- Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, et al. Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 1997; 56:414–420.
- Boellaard JW, Schole W, Hoefer W. Species-specific ultrastructure of neuronal lipofuscin in Hippocampus and neocortex of subhuman mammals and humans. Ultrastruct Pathol. 2004;28(5-6):341–51.
- Borras D, Ferrer I, Pumarola M. Age related changes in the brain of the dog. Vet Pathol. 1999;36:202–211.
- Bosch MN, Pugliese M, Gimeno-Bayon J, Rodriguez MJ, Mahy N. Dogs with cognitive dysfunction syndrome: a natural model of Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2012;9:298–314.
- Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol. 2011;121(2): 171–181.
- Braak H, Braak E, Strothjohann M. Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangels and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. Neurosci Lett. 1994;171:1–4.
- Capucchio MT, Marquez M, Pregel P, et al. Parenchymal and vascular lesions in ageing equine brains: histological and immunohistochemical studies. J Comp Pathol. 2010;142(1):61–73.
- Castro-Fuentes R, Socas-Pe´rez R. Octodon degus: a strong attractor for Alzheimer research. Basic Clin Neurosci. 2013;4:91–96.
- Catricala` S, Torti M, Ricevuti G. Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. Immun Ageing. 2012;9(1):20.
- Cavanagh JB. Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. Brain Res Rev. 1999;29(2-3):265–295.
- Chambers JK, Uchida K, Harada T, et al. Neurofibrillary tangles and the deposition of a beta amyloid peptide with a novel N-terminal epitope in the brains of wild Tsushima leopard cats. PLOS ONE. 2012;7(10):e46452.
- Chambers JK, Uchida K, Nakayama H. White matter myelin loss in the brains of aged dogs. Exp Gerontol. 2012;47:263–269.
- Chen X, Errangi B, Li L, et al. Brain aging in humans, chimpanzees (Pantroglodytes), and rhesus macaques (Macaca mulatta): magnetic resonance imaging studies of macro- and microstructural changes. Neurobiol Aging. 2013; 34(10):2248–2260.
- Colle MA, Hauw JJ, Crespeau F, et al. Vascular and parenchymal Ab deposition in the ag-

ing dog: correlation with behavior. Neurobiol Aging. 2000;21: 695–704.
– Cork LC, Powers RE, Selkoe DJ, Davies P, Geyer JJ, Price DL. Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. J Neuropathol Exp Neurol. 1988;47(6): 629–641.
– Cummings BJ, Head E, Afagh AJ, Milgram NW, Cotman CW. Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. Neurobiol Learn Mem. 1996;66:11–23.
– DeMattei M, Levi AC, Fariello RG. Neuromelanic pigment in substantia nigra neurons of rats and dogs. Neurosci Lett. 1986;72(1):37–42.
– Dror Y, Stern F, Gomori MJ. Vitamins in the prevention or delay of cognitive disability of aging. Curr Aging Sci. 2014;7(3):187–213.
– Fankhauser R, Luginbuehl H, McGrath JT. Cerebrovascular disease in various animal species. Ann NY Acad Sci. 1965;127:817–860.
– Gavier-Widen D, Wells GA, Simmons MM, Wilesmith JW, Ryan J. Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. J Comp Pathol. 2001;124(1):52–59.
– Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. Prog Neurobiol. 2014;112:24–49.
– Glass D, Vinuela A, Davies MN, et al. Gene expression changes with age in skin, adipose tissue, blood and brain. Gen Biol. 2013;14(7):R75.
– Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. Nat Rev Neurosci. 2008;9(7):532–544.
– Gunn-Moore DA. Cognitive dysfunction in cats: clinical assessment and management. Top Companion Anim Med. 2011;26(1):17–24.
– Gunn-Moore DA, McVee J, Bradshaw JM, Pearson GR, Head E, Gunn-Moore FJ. Ageing changes in cat brains demonstrated by beta-amyloid and AT8- immunoreactive phosphorylated tau deposits. J Feline Med Surg. 2006;8:234–242.
– Gunn-Moore D, Moffat K, Christie LA, Head E. Cognitive dysfunction and the neurobiology of ageing in cats. J Small Anim Pract. 2007;48:546–553.
– Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002; 297(5580):353–356.
– Hartig W, Klein C, Brauer K, et al. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. Neurobiol Aging. 2001;22(1):25–33.
– He XJ, Nakayama H. Neurogenesis in neurotoxin-induced animal models for Parkinson's disease—a review of the current status. J Toxicol Pathol. 2009;22: 101–108.
– Head E, Liu J, Hagen TM, et al. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. J Neurochem. 2002;82(2):375–381.
– Head E, McCleary R, Hahn FF, Milgram NW, Cotman CW. Region-specific age at onset of beta-amyloid in dogs. Neurobiol Aging. 2000;21:89–96.
– Head E, Moffat K, Das P, et al. Beta-amyloid deposition and tau phosphorylation in clinically characterized aged cats. Neurobiol Aging. 2005;26:749–763.
– Hwang IK, Yoo KY, Li H, et al. Differences in doublecortin immunoreactivity and protein levels in the hippocampal dentate gyrus between adult and aged dogs. Neurochem Res. 2007;32:1604–1609.
– Insua D, Suarez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P. Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. Neurobiol Aging. 2010;31:625–635.
– Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease. J Alzheimers Dis. 2002;4: 235–238.
– Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. J Cell Mol Med. 2008;12:38–55.

– Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Lancet Neurol. 2013;12(2):207–216.
– Jahns H, Callanan JJ, McElroy MC, et al. Age-related and non-age-related changes in 100 surveyed horse brains. Vet Pathol. 2006;43:740–750.
– Johnstone EM, Chaney MO, Norris FH, Pascual R, Little SP. Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. Brain Res Mol Brain Res. 1991;10:299–305.
– Kuroki K, Uchida K, Kiatipattanasakul W, et al. Immunohistochemical detection of tau proteins in various non-human animal brains. Neuropathology. 1997;17:174–180.
– Landsberg GM, Nichol J, Araujo JA. Cognitive dysfunction syndrome: a disease of canine and feline brain aging. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2012; 42:749–768, vii.
– Lorenz MD, Kornegay JN. Pelvic limb paresis, paralysis, or ataxia. In: Lorenz MD, Kornegay JN, eds. Handbook of Veterinary Neurology. 4th ed. St. Louis,
– MO: Saunders Elsevier;2004:154–155.
– Lovett MC, Fenner WR, Watson AT, Hostutler RA. Imaging diagnosis-MRI characteristics of a fourth ventricular cholesterol granuloma in a dog. Vet Radiol Ultrasound. 2012;53(6):650–654.
– Lowe J, Lennoxm G, Leigh NP. Disorders of movement and system degenerations. In: Graham DI, Lantos PL, eds. Greenfield's Neuropathology. London, UK: Arnold; 1997:339–341.
– Liang CL, Nelson O, Yazdani U, Parichehr Pasbakhsh P, German DC. Inverse relationship between the contents of neuromelanin pigment and the vesicular monoamine transporter-2: human midbrain dopamine neurons. J Comp Neurol. 2004;473:97–106.
– Mandara MT. Meningeal blood vessel calcification in the brain of the cat. Acta Neuropathol. 2003;105:240–244.
– Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, et al. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. Neuron. 1994;13:989–1002.
– Maxie MG, Youssef S. Nervous system. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed, vol. 1. Philadelphia, PA: Elsevier; 2007:281–457.
– Melis J, Jonker M, Vijg J, Hoeijmakers J, Breit T, Steeg H. Ageing on a different scale chronological versus pathology-related ageing. Ageing. 2013; 5(10):782–788.
– Milgram NW, Head E, Weiner E, Thomas E. Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspatial visual tasks. Behav Neurosci. 1994;108:57–68.
– Morgan KT, Johnson BP, Frith CH, Townsend J. An ultrastructural study of spontaneous mineralization in the brains of aging mice. Acta Neuropathol. 1982;58(2):120–124
– Marquez M, Serafin A, Ferna´ndez-Bellon H, et al. Neuropathologic findings in an aged albino gorilla. Vet Pathol. 2008;45: 531.
– Martınez J, Montgomery DL, Uzal FA. Vascular mineralization in the brain of horses. J Vet Diagn Invest. 2012;24(3):612–617.
– Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. Neuron. 1993;10:1151–1160.
– Morita T, Mizutani Y, Sawada M, Shimada A. Immunohistochemical and ultrastructural findings related to the blood—brain barrier in the blood vessels of the cerebral white matter in aged dogs. J Comp Pathol. 2005;133:14–22.
– Nakamura S, Tamaoka A, Sawamura N, et al. Carboxyl end-specific monoclonal antibod-

ies to amyloid beta protein (A beta) subtypes (A beta 40 and A beta 42(43)) differentiate A beta in senile plaques and amyloid angiopathy in brains of aged cynomolgus monkeys. Neurosci Lett. 1995;201:151–154.
– Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. J Neuropathol Exp Neurol. 2009;68(1):1–14.
– Nelson PT, Greenberg SG, Saper CB. Neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. Neurosci Lett. 1994;170:187–190.
– Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science. 2006;314(5796):130–133.
– Oenzil F, Kishikawa M, Mizuno T, Nakano M. Age-related accumulation of lipofuscin in three different regions of rat brain. Mech Ageing Dev. 1994;76: 157–163.
– Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathology. 2008;28:109–115.
– Oikawa N, Kimura N, Yanagisawa K. Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition. Brain Res. 2010;1315:137–149.
– Ozsoy S¸ Y, Haziroglu R. Age-related changes in cat brains as demonstrated by histological and immunohistochemical techniques. Revue Me´d Ve´t. 2010; 161(12):540–548.
– Papaioannou N, Tooten PCJ, van Ederen AM, et al. Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. Amyloid: J Protein Folding Disord. 2001;8:11–21.
– Pekcec A, Baumgartner W, Bankstahl JP, Stein VM, Potschka H. Effect of aging on neurogenesis in the canine brain. Aging Cell. 2008;7:368–374.
– Porta EA. Pigments in aging: an overview. Ann NY Acad Sci. 2002;959:57–65.
– Pugliese M, Gangitano C, Ceccariglia S, et al. Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. Brain Res. 2007;1139:85–94.
– Pugliese M, Geloso MC, Carrasco JL, Mascort J, Michetti F, Mahy N Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100beta (-) astrocytosis but not with insulin cerebrospinal fluid level. Acta Neuropathol. 2006;111:519–528.
– Roertgen KE, Parisi JE, Clark HB, Barnes DL, O'Brien TD, Johnson KH. A beta-associated cerebral angiopathy and senile plaques with neurofibrillary tangles and cerebral hemorrhage in an aged wolverine (Gulo gulo). Neurobiol Aging. 1996;17(2):243–247.
– Ronald JA, Chen Y, Bernas L, et al. Clinical field-strength MRI of amyloid plaques induced by low-level cholesterol feeding in rabbits. Brain. 2009;132: 1346–1354.
– Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, et al. A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. Br J Psychiatry. 1986;149: 698–709.
– Roynard P, Behr S, Barone G, Llabre´s-Diaz F, Cherubini GB. Idiopathic hypertrophic pachymeningitis in six dogs: MRI, CSF and histological findings, treatment and outcome. Small Anim Pract. 2012;53(9):543–548.
– Russell MJ, White R, Patel E, Markesbery WR, Watson CR, Geddes JW. Familial influence on plaque formation in the beagle brain. NeuroReport. 1992;3:1093–1096.
– Schultz C, Dehghani F, Hubbard GB, et al. Filamentous tau pathology in nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes of aged baboons. J Neuropathol Exp Neurol. 2000a;59(1):39–52.
– Schultz C, Hubbard GB, Ru¨b U, Braak E, Braak H. Age-related progression of tau pathology in brains of baboons. Neurobiol Aging. 2000b;21(6):905–912.

– Selkoe DJ, Bell DS, Podlisny MB, Price DL, Cork LC. Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. Science. 1987;235:873–877.
– Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011;1(1): a006189.
– Shimada A, Kuwamura M, Awakura T, Umemura T, Itakura C. An immunohistochemical and ultrastructural study on age-related astrocytic gliosis in the central nervous system of dogs. J Vet Med Sci. 1992;54(1):29–36.
– Serizawa S, Chambers JK, Une Y. Beta amyloid deposition and neurofibrillary tangles spontaneously occur in the brains of captive cheetahs (Acinonyx jubatus). Vet Pathol. 2012;49:304–312.
– Simic G, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. J Comp Neurol. 1997;379:482–494.
– Siwak-Tapp CT, Head E, Muggenburg BA, Milgram NW, Cotman CW. Neurogenesis decreases with age in the canine hippocampus and correlates with cognitive function. Neurobiol Learn Mem. 2007;88:249–259.
– Siwak-Tapp CT, Head E, Muggenburg BA, Milgram NW, Cotman CW. Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. Neurobiol Aging. 2008;29:521–528.
– Sulzer D, Mosharov E, Talloczy Z, Zucca FA, Simon JD, Zecca L. Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease. J Neurochem. 2008; 106(1):24–36.
– Summers BA, Cummings JF, deLahunta A. Principles of neuropathology. In: Summers BA, Cummings JF, deLahunta A, eds. Veterinary Neuropathology. St. Louis, MO: Mosby; 1995:208–350.
– Suzuki Y, Akiyama K, Suu S. Lafora-like inclusion bodies in the CNS of aged dogs. Acta Neuropathol. 1978;44(3):217–222.
– Suzuki Y, Ohta K, Kamiya S, Suu S. Topographic distribution pattern of Lafora-like bodies in the spinal cord of some animals. Acta Neuropathol. 1980;49(2):159–161.
– Suzuki Y, Suu S. Spheroids (axonal dystrophy) in the central nervous system of the dog. I. Light microscopic observations. Nihon Juigaku Zasshi. 1978; 40(3):325–334.
– Tapp PD, Siwak CT, Gao FQ, et al. Frontal lobe volume, function, and betaamyloid pathology in a canine model of aging. J Neurosci. 2004;24: 8205–8213.
– Tarragon E, Lopez D, Estrada C, et al. Octodon degus: a model for the cognitive impairment associated with Alzheimer's disease. CNS Neurosci Ther. 2013;19:643–648.
– Tofflemire KL, Whitley RD, Wong DM, et al. Episodic blindness and ataxia in a horse with cholesterinic granulomas. Vet Ophthalmol. 2013;16(2): 149–152.190. Tomlinson BE, Tchenerg D. Granulovascular degeneration of hippocampal pyramidal cells. J Pathol. 1972;106:165–185.
– Uchida K, Kihara N, Hashimoto K, Nakayama H, Yamaguchi R, Tateyama S. Age-related histological changes in the canine substantia nigra. J Vet Med Sci. 2003;65:179–185.
– Uchida K, Miyauchi Y, Nakayama H, Goto N. Amyloid angiopathy with cerebral hemorrhage and senile plaque in aged dogs. J Vet Me Sci. 1990;52: 605–611.
– Uchida K, Nakayama H, Goto N. Pathological studies on cerebral amyloid angiopathy, senile plaques and amyloid deposition in visceral organs in aged dogs. J Vet Med Sci. 1991;53:1037–1042.
– Uchida K, Yoshino T, Yamaguchi R, et al. Senile plaques and other senile changes in the brain of an aged American black bear. Vet Pathol. 1995;32(4): 412–414.

– Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O, Ikeda K, Tsuchiya K. Different conformation of neuronal tau deposits distinguished by double immunofluorescence with AT8 and thiazin red combined with Gallyas method. Acta Neuropathol. 2001;102:462–6.
– Vite CH, Head E. Aging in the canine and feline brain. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2014;44:1113–1129.
– von Sandersleben J, el Sergany MA. A study of so-called ossifying spinal pachymeningitis in the dog with special reference to its pathogenesis and etiology. Zentralbl Veterinarmed A. 1966;13:526–540.
– Walker LC. Animal models of cerebral beta-amyloid angiopathy. Brain Res. 1997;25:70–84.
– Wegiel J, Wisniewski HM, Dziewiatkowski J, et al. The origin of amyloid in cerebral vessels of aged dogs. Brain Res. 1995;705(1-2):225–234.
– Wegiel J, Wisniewski HM, Soltysiak Z. Region- and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. Brain Res. 1998;802:259–266.
– West MJ. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. Neurobiol Aging. 1993;14:287–293.
– Wohlsein P, Deschl U, Baumga¨rtner W. Nonlesions, unusual cell types, and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. Vet Pathol. 2012;50(1):122–143.
– Yamazaki Y, Matsubara T, Takahashi T, et al. Granulovacuolar degenerations appear in relation to hippocampal phosphorylated tau accumulation in various neurodegenerative disorders. PLOS ONE. 2011;6(11):e26996.
– Yanai T, Masegi T, Kawada M, et al. Spontaneous vascular mineralization in the brain of cows. J Comp Pathol. 1994;111:213–219.
– Yanai T, Masegi T, Ishikawa K, et al. Spontaneous vascular mineralization in the brain of horses. J Vet Med Sci. 1996;58:35–40.
– Yanai T, Masegi T, Ueda K, et al. Spontaneous globoid mineralization in the cerebellum of rats. J Comp Pathol. 1993;109: 447–451.
– Yanai T, Masegi T, Ueda K, et al. Vascular mineralization in the monkey brain. Vet Pathol. 1994;31:546–552.
– Yanai T, Yamoto T, Manabe J, Takaoka M, Matsunuma N. X-ray microanalysis of mineralization in the thalamus of aged mice. Nihon Juigaku Zasshi. 1987;49(5):920–922.
– Youssef S A, Capucchio MT, Rofina JE, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Head E. Pathology of aging brain in domestic and laboratory animals with special focus on animal models of human neurodegenerative diseases. Vet Pathol. 2016; 53: 327-48.
– Yu CH, Song GS, Yhee JY, et al. Histopathological and immunohistochemical comparison of the brain of human patients with Alzheimer's disease and the brain of aged dogs with cognitive dysfunction. J Comp Pathol. 2011;145:45–58.
– Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, Tampellini D. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. FEBS Lett. 2002;510:216–220.

MODELLI ANIMALI CANINI PER LO STUDIO DELLE DEGENERAZIONI RETINICHE UMANE

DANIELA GIRETTO

Medico Veterinario, Spec. Patologia e Clinica Animali Affezione, libero professionista

Le degenerazioni retiniche costituiscono un gruppo di patologie degenerative che portano a progressiva perdita della visione. Sebbene molto differenti dal punto di vista fenotipico, queste condizioni hanno diverse caratteristiche in comune: tutte sono determinate da una mutazione genica o hanno una componente genetica nella loro eziologia, tutte conducono a disfunzione dei fotorecettori, molte con interessamento sia dei coni che dei bastoncelli. Il meccanismo patogenetico che determina la morte cellulare, nella maggior parte dei casi, sembra sia ascrivibile a un processo di apoptosi. Si stima che nel mondo oltre 15 milioni di persone abbia deficit visivi imputabili a degenerazioni retiniche ereditarie. Per la maggior parte si tratta di pazienti che soffrono della forma secca di Degenerazione Maculare Senile e riescano a conservare una parziale funzione visiva; altri soggetti soffrono, invece, di altre condizioni degenerative come la Retinite Pigmentosa, l'Amaurosi Congenita di Leber, la Distrofia Maculare di Best, che possono indurre gravi deficit visivi se non addirittura completa cecità.

Esistono diversi modelli animali spontanei disponibili per lo studio di queste patologie; molte delle mutazioni geniche presenti negli animali sono state evidenziate anche in campo umano. I modelli animali, dunque, riproducono la patologia umana non solo dal punto di vista fenotipico di perdita della visione, ma anche da quello genetico.

I modelli animali si collocano in posizioni differenti nella scala filogenetica.

Nel punto più basso della scala troviamo il moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*) lo studio del quale è risultato estremamente utile nella comprensione delle normali vie del processo visivo così come il Danio zebrato o pesce zebra.

Per quanto riguarda i mammiferi, è nel topo che è stata descritta per la prima volta una forma di degenerazione retinica spontanea, nel 1920, ed è quindi il topo ad essere diventato il primo ampio modello di ricerca per queste forme a trasmissione recessiva. Di particolare rilevanza è la scoperta nel ratto RCS, affetto da degenerazione retinica, di una mutazione del gene MERTK. Questo gene codifica una proteina strutturale di transmembrana che stabilizzai dischi del segmento esterno dei fotorecettori: mutazioni a questo livello sono state associate ad alterazioni del meccanismo di fagocitosi nell'epitelio pigmentato della retina e conseguente degenerazione fotorecettoriale. Identificato successivamente anche nell'uomo, questo gene mutato sembra essere responsabile di oltre 40 forme di degenerazione retinica, che vanno dalla Retinite Pigmentosa alla Degenerazione Maculare Progressiva. Questo è un esempio di come l'analisi genetica di un singolo modello animale possa portare a un miglioramento nella comprensione di forme diverse di degenerazione retinica umana.

Anche nel cane sono stati descritti quadri differenti di degenerazione retinica ereditaria. Aguirre *et al*. ne hanno identificato e caratterizzato parecchie forme e questo ha permesso di avere a disposizione più modelli differenti di malattia.

L'occhio del cane (foto 1), nonostante abbia aspetti morfologici tipici, come la presenza nella coroide di una struttura denominata "tappeto lucido" (al di sopra della quale vi è l'epitelio pigmentato della retina che in questa regione risulta privo di pigmento), presenta molte

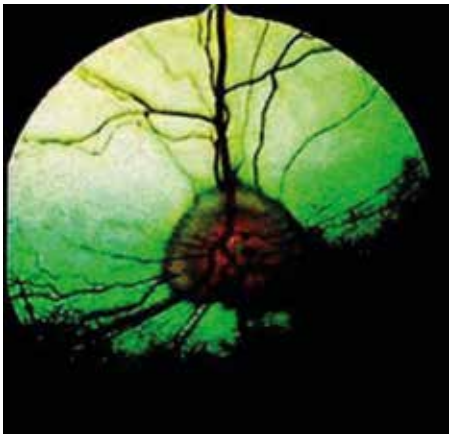


Foto 1. Cane, fondo oculare normale. Si osserva il disco ottico, la zona tappetale in alto e la regione non tappetale più scura ventralmente.

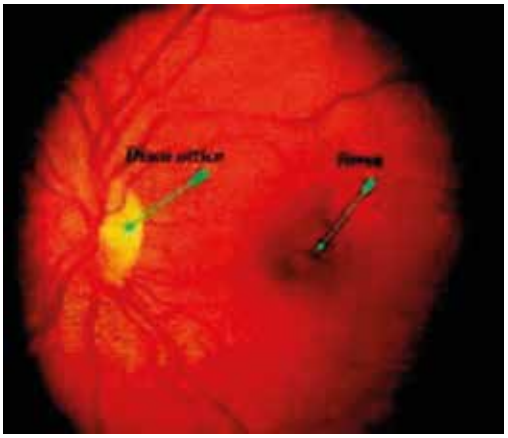


Foto 2: Uomo, fondo oculare normale. Si osserva la mancanza di una regione tappetale e la presenza di un'area più scura ad alta densità di fotorecettori chiamata macula, al cui centro è presente la fovea ad alta densità di coni.

similitudini con l'occhio umano sia per quanto riguarda la taglia sia per quanto concerne la distribuzione e la densità dei fotorecettori.

Nella retina umana (foto 2) è presente una regione chiamata macula che ha una altissima densità di fotorecettori; all'interno della macula è contenuta la fovea, area in cui sono presenti unicamente coni, e che consente una altissima definizione dei dettagli. La macula e la fovea sono dunque fondamentali per l'acutezza visiva e la percezione dei colori.

Gli animali da laboratorio comunemente impiegati come modelli per lo studio delle distrofie retiniche non possiedono questa regione retinica centrale ad alta densità fotorecettoriale.

Uno dei maggiori vantaggi del cane consiste nel possedere, invece, una regione specifica. denominata area centralis che ha con un'alta concentrazione di fotorecettori, in particolare coni, cosa che la rende simile alla macula umana. Sebbene la densità dei fotorecettori nell'area centralis non sia così alta come nella macula e il cane non possieda una vera e proprie fovea, tuttavia è stato recentemente dimostrato che al centro dell'area centralis vi è una piccola zona di soli coni, molto simile alla fovea.

Alcune retinopatie ereditarie del cane rappresentano un modello spontaneo per diverse forme di patologie umane, tra cui l'amaurosi congenita di Leber. la retinite pigmentosa, la distrofia dei coni e dei bastoncelli, l'acromatopsia e la distrofia maculare di Best (tabella 1).

Distrofia retinica RPE65 (cane) e Amaurosi Congenita di Leber (uomo)

Inizialmente definita come "cecità notturna congenita del Briard" (CSNB) (foto 3). Questa forma di distrofia ha una trasmissione autosomica recessiva, ed è provocata da una mutazione nel gene RPE 65 localizzato nell'epitelio pigmentato della retina (RPE).

Soggetti affetti presentano inizialmente cecità in condizioni di luce debole o assente, spesso associata a nistagmo e a riflessi fotomotori attenuati. La visione diurna risulta inizialmente conservata, ma successivamente si assiste a una progressiva riduzione anche del visus anche in ambiente luminoso, in grado variabile a seconda dei soggetti.

Condizione	Gene	Razza
Modelli di Amaurosi congenita di Leber		
Cecità notturna stazionaria congenita *Distrofia della retina (CSNB)*	Rpe65	*Briard*
Modelli di Retinite Pigmentosa Autosomica Recessiva		
Displasia bastoncelli-coni tipo 1	Pde6b	*Setter Irlandese*
Displasia bastoncelli-coni tipo la	Pde6b	Sloughi
	Pde6b	American Staffordshire terrier
Displasia bastoncelli-coni tipo 2	CIorf36	Collie
Diplasia bastoncelli-coni tipo3	Pde6a	*Cardigan Welsh corgi*
Degenerazione retinica precoce	Stk38l	Norwegian elkhound
Atrofìa retinica tipo 1	Slc4A3	Golden retriever
Atrofia retinica progressive del Papillon tipo 1	Cngbl	Papillon
Atrofia retinica progressiva	Ccdc66	Schapendoes
Atrofia retinica progressiva	Sag	Basenji
Degenerazione progressiva bastoncelli-coni	Prcd	Molte razze
Degenerazione progressiva bastoncelli-coni tipo 4	C2orf7l	Gordon setter
Modelli di Retinite Pigmentosa Autosomica Dominante		
Atrofia retina Autosomica Dominante	Rhodopsin	*Mastiff*
Retinite Pigmentosa legata a cromosoma X		
Atrofia retinica legata a cromosoma X tipo 1	Rpgr	*Siberian husky e Samoiedo*
Atrofia retinica legata a cromosoma X tipo 2	Rpgr	*Meticcio*
Modelli di Distrofia coni e bastoncelli		
Distrofia coni e bastoncelli 2	Iqcbl	Pit bull terrier
Distrofia coni e bastoncelli 3	Adam9	Glen of Imaal terrier
Distrofia coni e bastoncelli	Nphp4	Bassotto standard a pelo duro
Distrofia coni e bastoncelli	Rpgripl	*Bassotto Miniature* *a pelo lungo*
Modelli di Acromatopsia		
Acromatopsia	Cngb3	*Alaskan Malamute*
Acromatopsia	Cngb3	*Pointer tedesco*
Acromatopsia	Cnga3	Pastore tedesco
Modelli di Distrofia maculare		
Retinopatia multifocale tipo 1	Best 1	*Mastiff and related breeds*
Retinopatia multifocale tipo 2	Best 1	Coton de Tulear
Retinopatia multifocale tipo 3	Best 1	*Lapponian herder*

Per le patologie scritte in corsivo sono in sperimentazione terapie geniche.

Tabella 1. Modelli canini di degenerazione retinica in cui è stato identificata una mutazione genica

Foto 3. Cane Briard di 4 mesi, affetto da CSNB: le alterazioni del fondo oculare sono ancora poco evidenti.

Foto 4. Uomo, amaurosi congenita di Leber.

Nonostante i cani affetti manifestino importanti deficit visivi, a livello cellulare retinico si verifica un processo degenerativo piuttosto lento, caratterizzato da accumuli di lipidi nell'epitelio pigmentato e da degenerazione secondaria dei fotorecettori.

Nell'uomo l'amaurosi congenita di Leber (foto 4) è una patologia genetica retinica che provoca cecità o grave danneggiamento della vista fin dalla infanzia (in genere l'esordio è nei primi sei mesi di vita). È la causa più frequente di cecità infantile ereditaria, con un'incidenza di 3 casi ogni 100.000 nati vivi. Oltre alla marcata ipovisione, un altro sintomo tipico è il nistagmo.

Si conoscono 15-20 geni associati all'amaurosi congenita di Leber; nel 5-10% dei casi la malattia è causata da mutazioni del gene RPE65. La trasmissione avviene con modalità autosomica recessiva.

Briard affetti da CSNB sono stati utilizzati con successo in sperimentazioni di terapia genetica: si è proceduto inserendo tramite iniezioni subretiniche una copia normale del gene RPE65 nell'epitelio pigmentato, utilizzando quali agenti vettori adenovirus. Questo ha portato al ripristino di un corretto ciclo visivo, una normalizzazione dei riflessi fotomotori, riduzione del nistagmo, con recupero duraturo della funzionalità retinica e del visus, e ha aperto così la strada alla sperimentazione anche in campo umano (foto 5, 6).

Distrofia dei coni e bastoncelli (cane) e Distrofia dei coni e bastoncelli (uomo)

Le distrofie dei coni e dei bastoncelli costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie retiniche degenerative caratterizzate da una disfunzione primaria dei coni e secondariamente, in misura minore, dei bastoncelli. La patologia si presenta sotto forme differenti a seconda della razza interessata, ed è ascrivibile a diverse mutazioni geniche.

Nel Bassotto Tedesco a pelo duro la patologia è ascrivibile a una delezione del gene NPHP4 situato nel cromosoma 5, e ha una trasmissione autosomica recessiva. Determina una ceci- tà diurna precoce con segni clinici che compaiono tra le 4 e le 12 settimane e

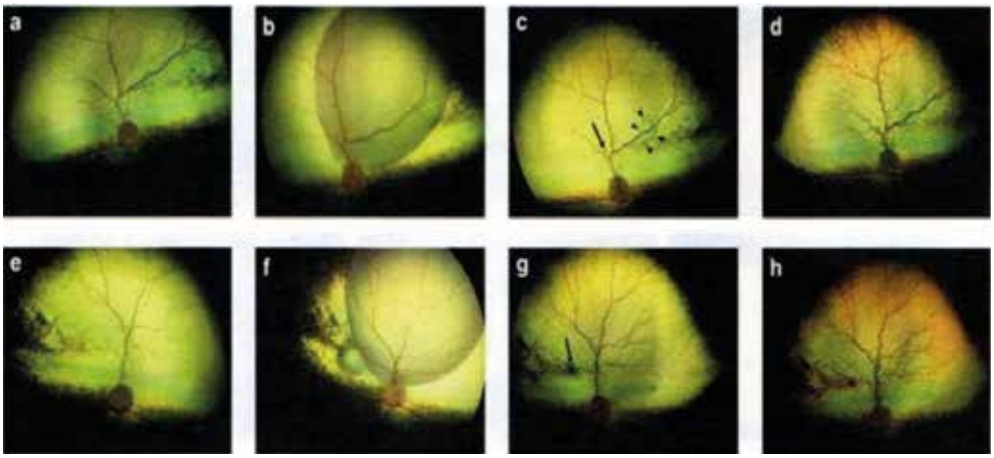


Foto 5. Cane Briard. Immagini del fondo oculare del primo e del secondo occhio sottoposto a iniezione subretinica. L'occhio destro è stato inoculato per primo, il sinistro dopo 90 gg. (a) OD pre-iniezione; (b) OD subito dopo iniezione sub retinica; (c) 1 settimana dopo inoculo; in questo occhio persiste una piccola raccolta di fluido (indicate dalla freccia in c); (d) OD 1 anno post-inoculo; (e) OS pre-inoculo; (f) OS subito dopo inoculo subretinico; (g) OS 1 settimana dopo inoculo; (h) OS 1 anno post-inoculo. Le cicatrici residue nel punto di inoculo sono indicate dalla freccia (c, g).

gradualmente progrediscono coinvolgendo anche i bastoncelli e di conseguenza la visione crepuscolare e notturna. Quadri oftalmoscopici di interessamento della zona non tappetale con aree di depigmentazione appaiono intorno ai 3 anni.

Nel Bassotto Tedesco a pelo lungo, la distrofia dei coni e dei bastoncelli (cord 1) ha una trasmissione autosomica recessiva ed è legata ad una mutazione del gene RPGRIP1 sul cromosoma 15. Variazioni oftalmoscopiche si osservano già all'età di 6 mesi, e includono aumento della granulosità del tappeto seguita iperriflettività tappetale e attenuazione della vascolarizzazione retinica. In seguito si verifica una perdita focale di pigmento nella zona non tappetale e atrofia della papilla ottica. Mutazioni nel gene RPGRIP 1 possono determinare nell'uomo alcune forme recessive di Amaurosi Congenita di Leber o una forma recessiva di Distrofia dei coni e dei bastoncelli (foto 7).

Distrofie dei coni e dei bastoncelli sono state descritte anche nel Pitt Bull Terrier (cord 2) per mutazione del gene IQCB1, con segni oftalmoscopici a 3-6 mesi, cecità diurna precoce e cecità completa a 1 anno, e nel Glen of Imaal Terrier (crd 3) per una mutazione nel gene ADAM9. In questa razza i segni oftalmoscopici compaiono intorno ai 3 anni e progrediscono nel tempo fino a una degenerazione completa; i soggetti affetti manifestano inizialmente difficoltà a evitare gli ostacoli in ambiente luminoso e peggiorano nel corso degli anni fino a cecità completa. La rcd3 ha caratteristiche molto simili alla Distrofia dei coni e bastoncelli tipo 9 dell'uomo.

Nell'uomo le Distrofie dei coni e dei bastoncelli (CRD) sono distrofie retiniche ereditarie, che appartengono al gruppo delle Retiniti Pigmentose (foto 8). A differenza della forma classica di Retinite Pigmentosa (RP), nota anche come distrofia dei bastoncelli e dei coni (RCD), che è dovuta alla perdita primitiva dei bastoncelli e secondariamente dei coni, le CRD sono caratterizzate da una sequenza opposta.

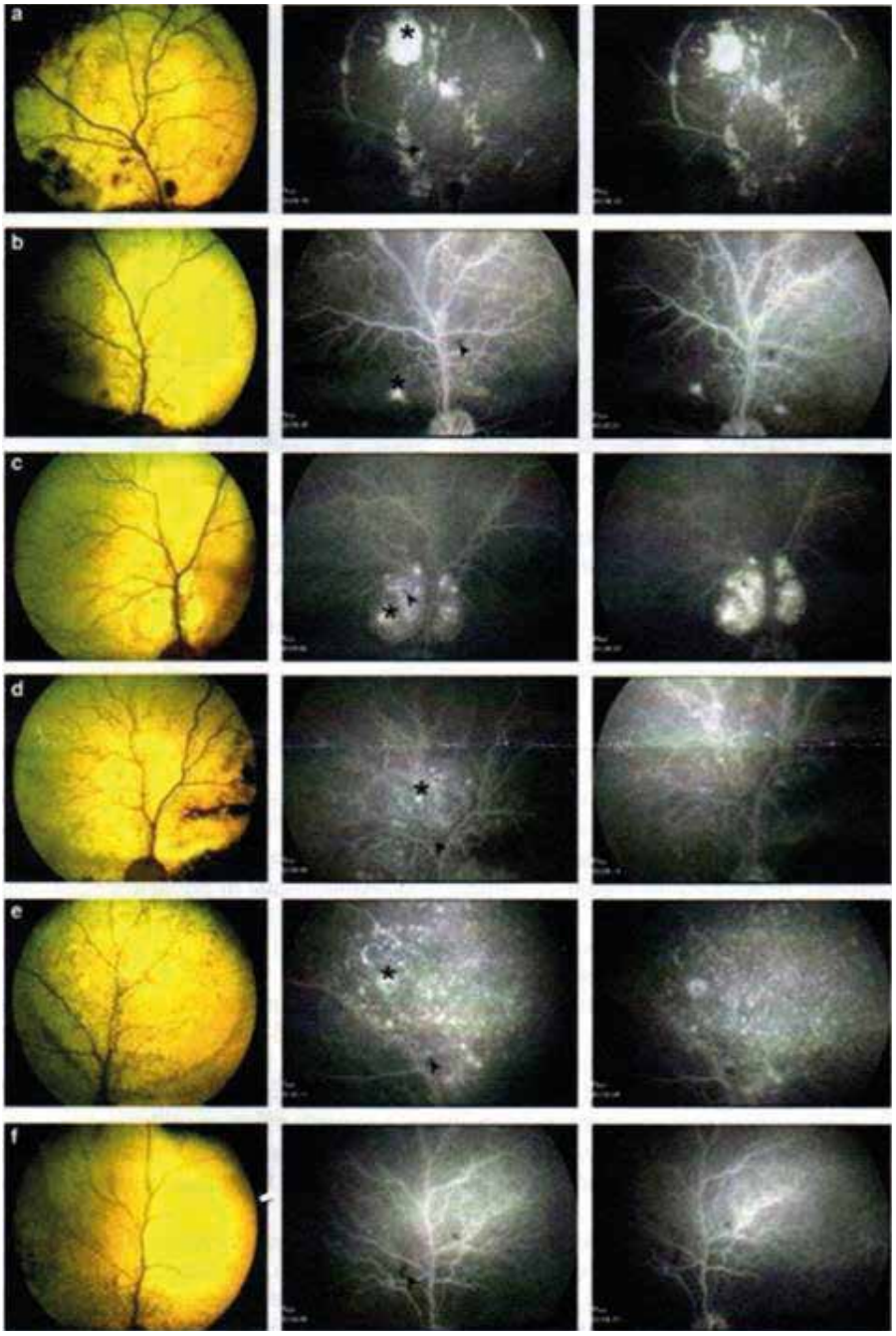


Foto 6. Cane Briard. Fotografie del fondo oculare e fluoroangiografia di iniezioni subretiniche con gene RPE65 normale dopo 2 e 4 mesi. (a), (b), (c), (d) Cani affetti iniettati con gene normale su vettore adenovirale; (e) cane affetto iniettato con solo vettore; (f) cane non affetto iniettato con solo vettore; > sito di inoculo; *aree di iperfluorescenza.

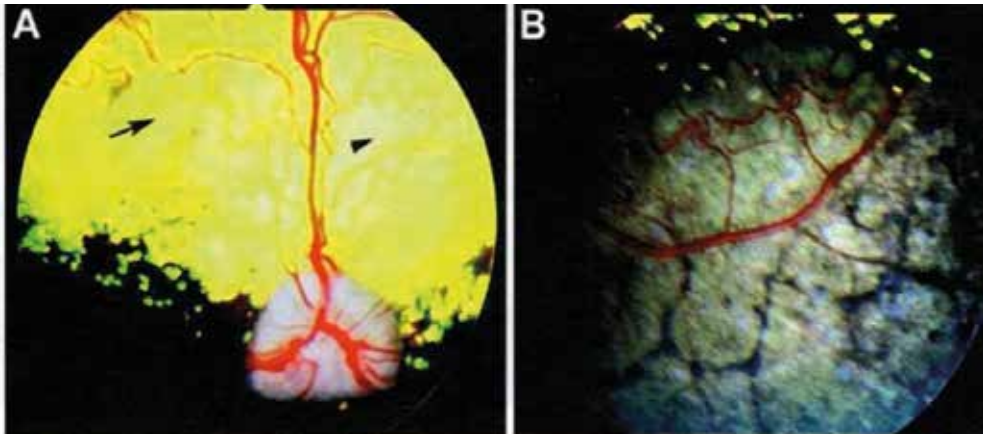


Foto 7. Bassotto tedesco di 6 mesi, affetto da cord 1, fondo oculare. (A) I vasi retinici sono leggermente assottigliati (freccia) ed è presente un moderato aumento dell'iperriflessia dell'iperriflessia del tappeto (punta di freccia); (B) caratteristiche aree di depigmentazione associate a margini iperpigmentati nella regione non tappetale.

I sintomi della CRD consistono essenzialmente in una riduzione dell'acuità visiva, difetti della visione dei colori, fotofobia e diminuzione della sensibilità visiva centrale, seguiti successivamente dalla perdita progressiva della visione periferica e dalla cecità notturna. Il decorso clinico della CRD è di solito grave e rapido. I principali geni coinvolti nella patogenesi sono RPGRIP1, ABCA4 (che causa la malattia di Stargard e il 30-60% delle CRD autosomiche recessive), CRX e GUCY2D (responsabili di numerose forme di CDR autosomiche dominanti) e RPGR (che causa circa i 2/3 delle RP legate all'X).

Nel modello canino di crd1 è stata effettuata una sperimentazione di terapia genetica con vettori adenovirali associati a DNA canino normale senza mutazione del gene RPGRIP1, introdotti tramite iniezione subretinica. È stato osservato un miglioramento della situazione in termini di parziale ripristino della risposta dei coni, un parziale recupero della visione sia in luce soffusa sia intensa ma, di contro un notevole assottigliamento dello spessore retinico

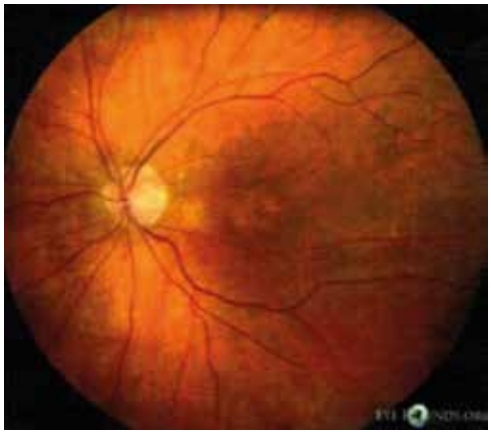


Foto 8. Uomo, fondo oculare. Distrofia coni-bastoncelli con aree di degenerazione retinica.

Displasia dei bastoncelli e dei coni (cane) e Retinite Pigmentosa autosomica recessiva (uomo)

La Displasia dei bastoncelli e dei coni(rcd) è una condizione a trasmissione autosomica recessiva descritta in 4 razze di

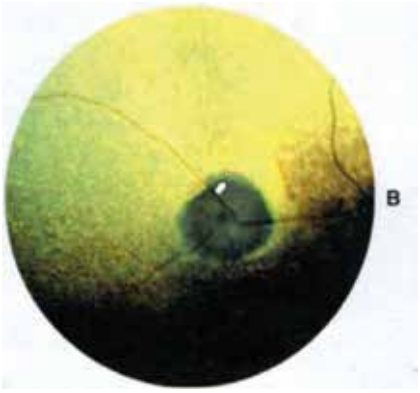


Foto 9. Cane setter di 4 mesi, affetto da rcd 1. Si evidenziano iperriflessia del tappeto e attenuazione del calibro dei vasi retinici.

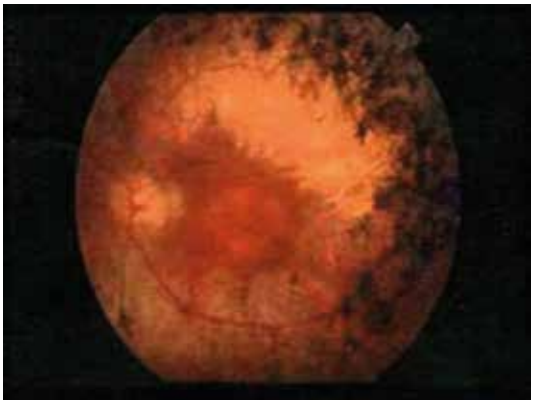


Foto 10. Uomo, retinite pigmentosa. Accumulo di pigmento e atrofia retinica.

cani. Nel Setter Irlandese (foto 9) e nello Sloughi (rcd 1) si verifica per difetto del gene che codifica la subunità beta (PDE6B) del guanosinmonofosfato ciclico (c GMP) e si manifesta con cecità notturna a 6-8 settimane che evolve a cecità completa entro l'anno.

Nel Collie (rcd 2) si verifica per mutazione del gene CLORF36; anche in questa razza si ha cecità notturna a 6 settimane e completa a 1-2 anni.

Nel Cardigan Welsh Corgi avviene per difetto del gene che codifica la subunità alfa del cGMP Nel caso della rcd1 e rcd3 la mutazione porta a un accumulo del cGMP nei bastoncelli con conseguente morte cellulare per apoptosi.

Nell'uomo la Retinite Pigmentosa (RP) (foto 10) è una distrofia retinica ereditaria, causata dall'arresto della crescita del segmento esterno dei fotorecettori con una relativamente rapida perdita dei bastoncelli seguita da una più lenta perdita dei coni, caratterizzata oftalmoscopicamente da depositi retinici di pigmento.

Colpisce all'incirca 1 persona ogni 4000. La forma più comune è la distrofia tipo bastoncelli-coni, che insorge con cecità notturna e perdita della visione periferica, seguita dalla perdita progressiva della vista diurna, che può portare a cecità dopo diversi anni. Alcuni casi estremi possono avere una rapida evoluzione o una lenta progressione che non porta mai a cecità. In altri casi, la presentazione clinica è una distrofia tipo coni-bastoncelli, nella quale la riduzione dell'acuità visiva predomina sulla perdita del campo visivo. Sono stati identificati circa 50 geni/loci responsabili della RP (forme autosomiche dominanti, autosomiche recessive, legate al cromosoma X e digeniche).

Le mutazioni PDE6A e PDE6B sono responsabili del 3-4% e del 4-5% rispettivamente dei casi autosomici recessivi. Al momento, non è disponibile una terapia, per questo l'utilizzo di modelli canini per la terapia genica riveste un ruolo di notevole importanza.

Degenerazione Progressiva dei Bastoncelli e dei Coni (cane) e Retinite Pigmentosa autosomica recessiva (uomo)

Un ulteriore modello canino per questa forma di Retinite Pigmentosa è rappresentato dalla Degenerazione Progressiva dei Bastoncelli e dei Coni (prcd). Si tratta di una forma a in-

sorgenza tardiva di degenerazione dei fotorecettori, legata alla mutazione del gene PRCD situato sul cromosoma 9 e descritta in una ventina di razze (Barboncino, Labrador Retriever, Pastore Australiano, Cocker Inglese, Cocker Americano e altre).

Anch'essa a trasmissione autosomica recessiva, è caratterizzata da una perdita iniziale della funzionalità dei bastoncelli seguita da quella dei coni.

Le lesioni visibili oftalmoscopicamente sono bilaterali e simmetriche e includono un'alterazione nella colorazione del tappeto con aree di colorazione grigiastra soprattutto nella porzione periferica, cui fa seguito una iperriflessia del tappeto con attenuazione della vascolarizzazione, decolorazione della regione non tappetale e atrofia della testa del nervo ottico.

L'età di insorgenza dei sintomi avviene tra i 3 e i 5 anni ma può variare a seconda della razza, così come la velocità di progressione (foto 11, 12).

Atrofia della retina legata al cromosoma X (cane) e Retinite Pigmentosa legata al cromosoma X (uomo)

L'atrofia retinica progressiva legata al cromosoma X colpisce il Siberian Husky e il Samoiedo (XLPRA 1) e i meticci (XLPRA 2). Colpisce solo i maschi, mentre le femmine sono portatrici, anche se sono state descritti casi di malattia anche in queste ultime, con segni

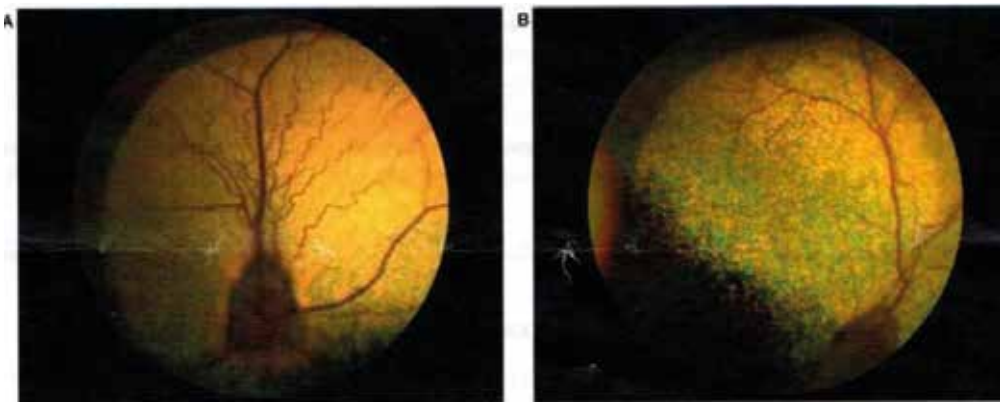


Foto 11. Cane Golden Retriever di 6 anni, variazioni del fondo oculare osservate nella forma tipica di prcd. A) Fondo oculare normale; B) fondo oculare con segni tipici di PRA. Il tappeto appare iperriflettente, i vasi retinici sono attenuati e il disco ottico è pallido.

Foto 12. Cane Barboncino 10 anni, fase terminale della atrofia retinica. Si nota la completa scomparsa della vascolarizzazione e la totale disorganizzazione della retina.

clinici più lievi. Entrambe le forme sono dovute a una mutazione del gene RPGR che viene espresso sia nei fotorecettori in via di sviluppo sia in quelli maturi. Nei maschi affetti la degenerazione iniziale dei bastoncelli è seguita dalla degenerazione dei coni e in seguito dalla completa atrofia della retina.

Nel primo tipo (XLPRA 1) si ha una degenerazione bastoncelli-coni più lenta con cecità notturna verso i 2-4 anni, mentre il secondo tipo (XLPRA2) è caratterizzato da una evoluzione molto più rapida con disorganizzazione del segmento esterno dei fotorecettori già a 4 settimane di età. In entrambi i modelli sono in atto terapie geniche sperimentali.

Atrofia della retina a trasmissione dominante (cane) e Retinite Pigmentosa dominante (uomo)

Una forma di atrofia retinica progressiva a trasmissione autosomica dominante è stata descritta nel Mastiff e nel Bull Mastiff. Questa forma è causata da una mutazione del gene della rodopsina (RHO), che è il pigmento visivo presente nei bastoncelli.

Intorno ai 6 mesi di età si possono cominciare a osservare aree di dimensione e localizzazione variabile di assottigliamento della retina con una degenerazione non uniforme dei fotorecettori. Elemento di particolare interesse è dato dal fatto che l'esposizione alla luce accelera il processo degenerativo, a differenza di quanto avviene nelle altre forme.

Numerose mutazioni a livello del gene della rodopsina determinano quadri di Retinite Pigmentosa nell'uomo. In particolare si evidenziano due fenotipi della malattia: il primo, a insorgenza precoce, è caratterizzato da una rapida e uniforme perdita di bastoncelli, mentre nel secondo la degenerazione si estende progressivamente a partire da una regione focale iniziale, analogamente a quanto si verifica nel cane.

Anche in questo caso nel modello animale sono in via di sperimentazione terapie geniche.

Acromatopsia o Degenerazione dei coni (cane) e Acromatopsia (uomo)

La Degenerazione dei coni è una patologia a trasmissione autosomica recessiva che colpisce l'Alaskan Malamute, il Pointer Tedesco a pelo corto e il Pastore Tedesco, determinata da una mutazione nel gene CNGB3. I soggetti affetti sviluppano cecità diurna e fotofobia tra le 8 e le 12 settimane, età in cui lo sviluppo retinico è solitamente completo.

sintomi di deficit visivo sono presenti solo in luce diurna, mentre la visione notturna viene conservata. All'età di 4 anni nella retina si evidenziano solo bastoncelli.

Nel cane si parla di emeralopia (assenza di visione diurna). La condizione è stata recentemente descritta anche nel Pastore Australiano miniature.

Nell'uomo una condizione simile alla degenerazione dei coni canina è stata ampiamente descritta e viene definita acromatopsia. L'acromatopsia è un difetto retinico raro, autosomico recessivo, caratterizzato da cecità ai colori, nistagmo, fotofobia e grave riduzione dell'acuità visiva a seguito della mancata o anomala funzione dei coni. L'acromatopsia è stata finora associata alle mutazioni di cinque geni (GNAT2, PDE6C, PDE6H, CNGA3 e CNGB3), che codificano per componenti chiave della cascata della fototrasduzione dei coni.

Il modello canino attualmente viene impiegato per sperimentazioni di terapia genica con adenovirus, vettori di geni non mutati inoculati per via subretinica.

Retinopatia Multifocale del cane e Degenerazione Maculare di Best (uomo)

La Retinopatia multifocale del cane (cmr) è una patologia a trasmissione autosomica re-

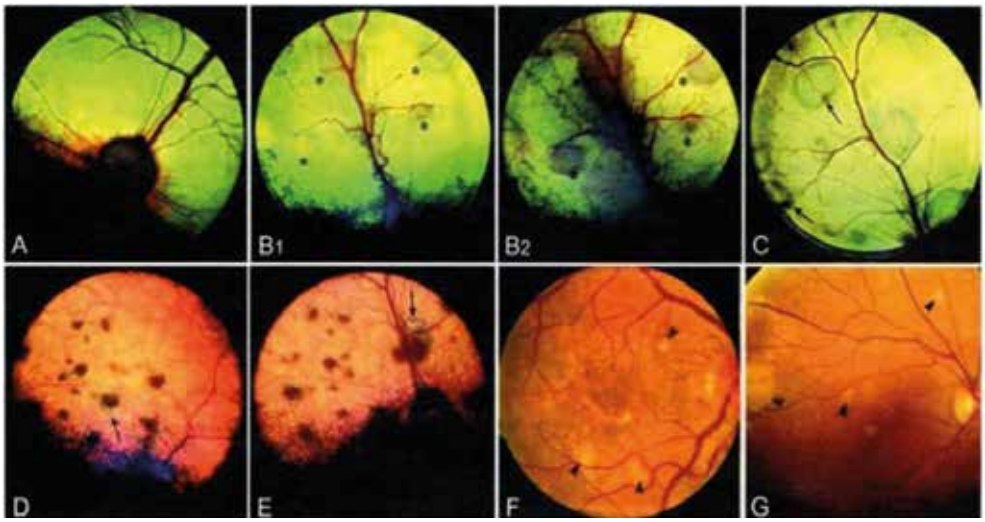


Foto 13. Fondo oculare, caratteristiche salienti della retina nel cmr1 e cmr2 e maculopatia di Best. (A) Fondo oculare normale in cui sono visibili la regione tappetale in alto e non tappetale in basso; nella regione tappetale l'epitelio pigmentato della retina è non pigmentato ed è disteso sopra lo strato tappetale della coroide. (B) Cane da Montagna dei Pirenei di 5 (B_1) e 8 (B_2) mesi di età; le lesioni retiniche (*) sono più evidenti a 8 mesi. (C) Coton de Tulear di 18 mesi di età con *cmr2;* il fluido subretinico è chiaro (freccia), sebbene 2 lesioni mostrino un accumulo di materiale rosato scuro. (D,E) Coton de Tulear di 15 mesi di età con *cmr2*; le lesioni multifocali presentano un accumulo di materiale marrone-rosato scuro; vicino a molte lesioni (freccia) il fluido subretinico appare sieroso. (F,G) Uomo, maculopatia multifocale di Best in foto di 30° e 60° di pazienti eterozigoti; lesioni multifocali (freccia) sono presenti in entrambi gli occhi.

cessiva in cui si assiste allo sviluppo di distacchi sierosi multipli, tondeggianti, con accumulo di materiale da sieroso a grigio rosato opaco, che insorgono tra i 3-4 mesi e l'anno di età.

La maggior parte delle lesioni è limitata alla zona tappetale anche se occasionalmente anche l'area non tappetale può risultare coinvolta (foto 13). Con il progredire dell'età, la quantità di siero presente nelle bolle diminuisce gradatamente e residuano aree focali di iperriflessia.

La patologia è determinata da una mutazione a carico del gene BEST, gene della bestrofina anche conosciuto come gene VMD2, che permette la formazione di pori nell'epitelio pigmentato della retina per il passaggio di Cl-.

Nel cane sono state identificate 3 mutazioni differenti a carico del gene BEST e questo comporta la presenza di 3 tipi di retinopatia: il tipo 1 presente nel Cane da Montagna dei Pirenei, nel Mastiff e nel Bull Mastiff, il tipo 2 nel Coton de Tulear e il tipo 3 nel Lapponian Herder.

La Distrofia Maculare vitelliforme di Best (BVMD) dell'uomo è una distrofia maculare genetica autosomica dominante, che si manifesta sotto forma di lesioni cistiche nella macula consistenti in ampi depositi di materiale nello spazio subretinico. In caso di coinvolgimento della fovea questo può portare in una grave perdita della visione centrale.

La malattie di Best esordisce durante l'infanzia e talvolta l'adolescenza (5-13 anni). Gli

individui affetti hanno una vista normale alla nascita. In seguito la patologia progredisce raggiungendo diversi stadi, che comprendono la fase previtelliforme asintomatica (stadio 1), seguita dalla formazione di una lesione giallognola "a tuorlo d'uovo" (vitelliforme) nella macula (stadio 2). Successivamente, si presenta una sostanza liquida vitellina di colore giallo (pseudoipopion o stadio 3), e alla fine residua una cicatrice che porta al deterioramento dell'acuità visiva centrale.

La BVMD è caratterizzata da una atrofia dell'epitelio pigmentato retinico che coinvolge poi i fotorecettori e causa una disfunzione della visione centrale. Nella maggior parte dei casi, la BVMD è causata dalle mutazioni di BEST1. Un difetto in questa proteina causa un accumulo di lipofuscina, secondario a uno scambio ionico anomalo.

Anche in questo modello canino sono in corso terapie geniche.

Bibliografia

- Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. Mol Ther 2005;12:1072-1082.
- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nat Genet 2001;28:92-95.
- Aguirre GD, Baldwin V, Pearce-Kelling S, et al. Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. Mol Vis 1998;4:23.
- Aguirre GD, Rubin LF. Rod-cone dysplasia (progressive retinal atrophy) in Irish setters. J Am Vet Med Assoc 1975;166:157-164.
- Aguirre GK, Komaromy AM, Cideciyan AV, et al. Canine and human visual cortex intact and responsive despite early retinal blindness from RPE65 mutation. PLoS Med 2007;4:e230.
- Amado D, Mingozzi F, Hui D, et al. Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness. Sci Transl Med 2010;2:21ra16.
- Annear MJ, Bartoe JT, Barker SE, et al. Gene therapy in the second eye of RPE65-deficient dogs improves retinal function. Gene Ther 2011;18:53-61.
- Annear MJ, Mowat FM, Bartoe JT, et al. Successful gene therapy in older Rpe65-deficient dogs following subretinal injection of an adeno-associated vector expressing RPE65. Hum Gene Ther 2013;24:883-893.
- Ashtari M, Cyckowski LL, Monroe JF, et al. The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. J Clin Invest 2011;121:2160-2168.
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 2008;358:2231-2239.
- Banin E, Bandah-Rozenfeld D, Obolensky A, et al. Molecular anthropology meets genetic medicine to treat blindness in the North African Jewish population: human gene therapy initiated in Israel. Hum Gene Ther 2010;21:1749-1757.
- Banin E, Obolensky A, Ejzenberg A, et al. Gene therapy in a sheep model of CNGA3 achromatopsia. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014;55:4566.
- Beltran WA, Cideciyan AV, Guziewicz KE, et al. Canine retina has a primate fovea-like bouquet of cone photoreceptors which is affected by inherited macular degenerations. PLoS One 2014;9:e90390.
- Beltran WA, Cideciyan AV, Lewin AS, et al. Gene augmentation for X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR. Cold Spring Harb Perspect Med 2014;pii:a017392.
- Beltran WA, Cideciyan AV, Lewin AS, et al. Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109:2132-2137.
- Beltran WA, Cideciyan AV, Lewin AS, et al. RPGR gene augmentation delivered at early, mid and late stage disease in a canine model of XLRP rescues photoreceptor structure and function. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014;55:3321.
- Bennett J, Ashtari M, Wellman J, et al. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. Sci Transl Med 2012;4:120ra15.
- Bennicelli J, Wright JF, Komaromy A, et al. Reversal of blindness in animal models of Leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. Mol Ther 2008;16:458-465.
- Br J Ophthalmol 1989;73:750-756.
- Carvalho LS, Xu J, Pearson RA, et al. Long-term and agedependent restoration of visual function in a mouse model of CNGB3-associated achromatopsia following gene therapy. Hum Mol Genet 2011;20:3161-3175.

– Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, et al. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:15112-15117.
– Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, et al. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. Hum Gene Ther 2009;20:999-1004.
– Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, et al. Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis.
– Cideciyan AV, Jacobson SG, Aleman TS, et al. In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:5233-5238.
– Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, et al. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:E517-E525.
– Cideciyan AV. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. Prog Retin Eye Res 2010;29:398-427.
– cone-rod dystrophy. Mol Ther 2014;22:265-277.
– Dejneka NS, Surace EM, Aleman TS, et al. In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. Mol Ther 2004;9:182-188.
– Dekomien G, Runte M, Godde R, et al. Generalized progressive retinal atrophy of sloughi dogs is due to an 8-bp insertion in exon 21 of the PDE6B gene. Cytogenet Cell Genet 2000;90:261-267.
– Dekomien G, Vollrath C, Petrasch-, Parwez E, et al. Progressive retinal atrophy in schapendoes dogs: mutation of the newly identified ccdc66 gen. Neurogenetics 2010;11:163-174.
– Den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, et al. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. Prog Retin Eye Res 2008;27:391-419.
– Downs LM, Bell JS, Freeman J, et al. Late-onset progressive retinal atrophy in the Gordon and Irish setter breeds is associated with a frameshift mutation in C2orf71. Anim Genet 2012;44:169-177.
– Downs LM, Wallin-Hakansson B, Boursnell M, et al. A frameshift mutation in golden retriever dogs with progressive retinal atrophy endorses SLC4A3 as a candidate gene for human retinal degenerations. PLoS One 2011;6:e21452.
– Dutrow EV, Tanaka N, Miyadera K, et al. A missense mutation in canine CNGA3 eliminates retinal cone function: a novel model for achromatopsia. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014;55:1641.
– Ford M, Bragadottir R, Rakoczy PE, et al. Gene transfer in the RPE65 null mutation dog: relationship between construct volume, visual behavior and electroretinographic (ERG) results. Doc Ophthalmol 2003;107:79-86.
– Garcia MM, Ying GS, Cocores CA, et al. Evaluation of a behavioral method for objective vision testing and identification of achromatopsia in dogs. Am J Vet Res 2010;71:97-102.
– Gaub BM, Berry MH, Holt AE, et al. Restoration of visual function by expression of a light-gated mammalian ion channel in retinal ganglion cells or ON-bipolar cells. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111:E5574-E5583.
– Goldstein O, Jordan JA, Aguirre GD, et al. A non-stop S-antigen gene mutation is associated with late onset hereditary retinal degeneration in dogs. Mol Vis 2013;19:1871-1884.
– Goldstein O, Kukekova AV, Aguirre GD, et al. Exonic SINE insertion in STK38l causes canine early retinal degeneration (erd). Genomics 2010;96:362-368.
– Goldstein O, Mezey JG, Boyko AR, et al. An ADAM9 mutation in canine cone-rod dystrophy 3 establishes homology with human cone-rod dystrophy 9. Mol Vis 2010;16:1549-1569.

– Goldstein O, Mezey JG, Schweitzer PA, et al. IQCB1 and PDE6B mutations cause similar early onset retinal degenerations in two closely related terrier dog breeds. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013;54:7005-7019.
– Gorbatyuk MS, Aguirre GD, Acland GM, et al. Molecular therapeutic approaches for treatment of autosomal dominant RP (ADRP) in a canine T4R rhodopsin model. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:2341.
– Guziewicz K, Beltran W, Cideciyan A, et al. Gene therapy for bestrophinopathies. Acta Ophthalmol 2014;92.
– Guziewicz K, Komaromy A, Iwabe S, et al. Sustained therapeutic reversal of canine bestrophinopathy with gene therapy using recombinant AAV2. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013;54:5965.
– Guziewicz KE, Zangerl B, Komaromy AM, et al. Re-combinant AAV-mediated BEST1 transfer to the retinal pigment epithelium: analysis of serotype-dependent retinal effects. PLoS One 2013;8:e75666.
– Guziewicz KE, Zangerl B, Lindauer SJ, et al. Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:1959-1967.
– Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. Lancet 2006;368:1795-1809.
– Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, et al. Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. Hum Gene Ther 2008;19:979-990.
– Iwabe S, Genini S, Sudharsan R, et al. Assessment of AAV-mediated RHO augmentation in the canine T4R RHO model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014;55:3316.
– Jacobs JB, Dell'osso LF, Hertle RW, et al. Eye movement recordings as an effectiveness indicator of gene therapy in RPE65-deficient canines: implications for the ocular motor system. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:2865-2875.
– Jacobs JB, Dell'osso LF, Hertle RW, et al. Gene therapy to abolish congenital nystagmus in RPE65-deficient canines. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:4249.
– Jacobs JB, Dell'osso LF, Wang ZI, et al. Using the NAFX to measure the effectiveness over time of gene therapy in canine LCA. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:4685-4692.
– Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, et al. Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. Mol Ther 2006;13:1074-1084.
– Jacobson SG, Aleman TS, Cideciyan AV, et al. Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:15123-15128.
– Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, et al. Gene therapy for Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. Arch Ophthalmol 2012;130:9-24.
– Jin M, Li S, Moghrabi WN, et al. Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. Cell 2005; 122:449-459.
– Koenekoop RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. Surv Ophthalmol 2004;49:379-398.
– Komaromy AM, Acland GM, Aguirre GD. Operating in the dark: a night-vision system for surgery in retinas susceptible to light damage. Arch Ophthalmol 2008;126: 714-717.
– Komaromy AM, Alexander JJ, Cooper AE, et al. Targeting gene expression to cones with human cone opsin promoters in recombinant AAV. Gene Ther 2008;15: 1049-1055.
– Komaromy AM, Alexander JJ, Rowlan JS, et al. Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. Hum Mol Genet 2010;19:2581-2593.

– Komaromy AM, Rowlan JS, Corr AT, et al. Transient photoreceptor deconstruction by CNTF enhances rAAV-mediated cone functional rescue in late stage CNGB3-achromatopsia. Mol Ther 2013;21:1131-1141.
– Kukekova AV, Goldstein O, Johnson JL, et al. Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rcd2) as ortholog of human and murine rd3. Mamm Genome 2009;20:109-123.
– Kuznetsova T, Iwabe S, Boesze-Battaglia K, et al. Exclusion of RPGRIP1 ins44 from primary causal association with early-onset cone-rod dystrophy in dogs. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53:5486-5501.
– Kuznetsova T, Zangerl B, Goldstein O, et al. Structural organization and expression pattern of the canine RPGRIP1 isoforms in retinal tissue. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:2989-2998.
– Lai CM, Yu MJ, Brankov M, et al. Recombinant adenoassociated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65-/- knockout mouse eye results in limited rescue. Genet Vaccines Ther 2004;2:3.
– Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, et al. Restoration of vision in RPE65-deficient briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. Gene Ther 2007;14:292-303.
– Lheriteau E, Petit L, Weber M, et al. Successful gene therapy in the RPGRIP1-deficient dog: a large model of
– Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet 2009;374: 1597-1605.
– Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis.
– Melillo P, Pecchia L, Testa F, et al. Pupillometric analysis for assessment of gene therapy in Leber congenital amaurosis patients. Biomed Eng Online 2012;11:40.
– Mellersh CS, Boursnell ME, Pettitt L, et al. Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. Genomics 2006;88:293-301.
– Michaelides M, Hunt DM, Moore AT. The cone dysfunction syndromes. Br J Ophthalmol 2004;88:291-297.
– Miyadera K, Kato K, Aguirre-Hernandez J, et al. Phenotypic variation and genotype-phenotype discordance in canine cone-rod dystrophy with an RPGRIP1 mutation. Mol Vis 2009;15:2287-2305.
– Miyadera K, Kato K, Boursnell M, et al. Genome-wide association study in RPGRIP1(-/-) dogs identifies a modifier locus that determines the onset of retinal degeneration. Mamm Genome 2012;23:212-223.
– Mowat F, Occelli L, Gervais K, et al. Rapid photoreceptor degeneration in the area centralis and visual streak of Rpe65-deficient dogs: morphologic and histologic characterization. ARVO Meet Abstr 2013;54:1776.
– Mowat FM, Bartoe JT, Bruewer A, et al. Evaluation of rod photoreceptor function and preservation following retinal gene therapy in the PDE6a mutant dog. ARVO Meet Abstr 2012;53:1928. Kijas JW, Cideciyan AV, Aleman TS, et al. Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99: 6328-6333.
– Mowat FM, Breuwer AR, Bartoe JT, et al. RPE65 gene therapy slows cone loss in Rpe65-deficient dogs. Gene Ther 2013;20:545-555.
– Mowat FM, Petersen-Jones SM, Williamson H, et al. Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. Mol Vis 2008; 14:2518-2527.

– N Engl J Med 2008;358:2240-2248.
– N Engl J Med 2009;361:725-727.
– Narfstrom K, Bragadottir R, Redmond TM, et al. Functional and structural evaluation after AAV.RPE65 gene transfer in the canine model of Leber's congenital amaurosis. Adv Exp Med Biol 2003;533:423-430.
– Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R, et al. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:1663-1672.
– Narfstrom K, Katz ML, Ford M, et al. In vivo gene therapy in young and adult RPE65-/- dogs produces long-term visual improvement. J Hered 2003;94:31-37.
– Narfstrom K, Seeliger M, Lai CM, et al. Morphological aspects related to long-term functional improvement of the retina in the 4 years following rAAV-mediated gene transfer in the RPE65 null mutation dog. Adv Exp Med Biol 2008;613:139-146.
– Narfstrom K, Vaegan, Katz M, et al. Assessment of structure and function over a 3-year period after gene transfer in RPE65-/- dogs. Doc Ophthalmol 2005;111:39-48.
– Narfstrom K, Wrigstad A, Nilsson SE. The briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness.
– Ophthalmology 2013;120:1283-1291.
– Pang JJ, Chang B, Kumar A, et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. Mol Ther 2006;13:565-572.
– Petersen-Jones SM, Annear MJ, Bartoe JT, et al. Gene augmentation trials using the Rpe65-deficient dog: contributions towards development and refinement of human clinical trials. Adv Exp Med Biol 2012;723:177-182.
– Petersen-Jones SM, Entz DD, Sargan DR. cGMP phosphodiesterase-a mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh corgi dog. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:1637-1644.
– Petit L, Lheriteau E, Weber M, et al. Restoration of vision in the pde6beta-deficient dog, a large animal model of rod-cone dystrophy. Mol Ther 2012;20:2019-2030.
– Redmond TM, Poliakov E, Yu S, et al. Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:13658-13663.
– RetNet, www.sph.uth.tmc.edu/RetNet
– Sidjanin DJ, Lowe JK, Mcelwee JL, et al. Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. Hum Mol Genet 2002;11:1823-1833.
– Sieving PA, Caruso RC, Tao W, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103: 3896-3901.
– Simonelli F, Maguire AM, Testa F, et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. Mol Ther 2010;18: 643-650.
– Stone EM. Leber congenital amaurosis—a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture. Am J Ophthalmol 2007;144:791-811.
– Suber ML, Pittler SJ, Quin N, et al. Irish setter dogs affected with rod-cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:3968-3972.
– Tao W, Wen R, Goddard MB, et al. Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces

photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43:3292-3298.
– Testa F, Maguire AM, Rossi S, et al. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital amaurosis type 2. 57. Ophthalmology 2013;120:1283-1291. Dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99: 6328-6333.
– Tuntivanich N, Pittler SJ, Fischer AJ, et al. Characterization of a canine model of autosomal recessive retinitis pigmentosa due to a PDE6a mutation. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:801-813.
– Turney C, Chong NH, Alexander RA, et al. Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:4240-4249.
– Veske A, Nilsson SE, Narfstrom K, et al. Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. Genomics 1999;57:57-61.
– Wang JS, Estevez ME, Cornwall MC, et al. Intra-retinal visual cycle required for rapid and complete cone dark adaptation. Nat Neurosci 2009;12:295-302.
– Wen R, Song Y, Kjellstrom S, et al. Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor. J Neurosci 2006;26:13523-13530.
– Wiik AC, Wade C, Biagi T, et al. A deletion in nephronophthisis 4 (NPHP4) is associated with recessive cone-rod dystrophy in standard wire-haired dachshund. Genome Res 2008;18:1415-1421.
– Winkler PA, Ekenstedt KJ, Occelli LM, et al. A large animal model for CNGBl autosomal recessive retinitis pigmentosa. PLoS One 2013;8:e72229.
– Wright RN, Hong DH, Perkins B. Misexpression of the constitutive Rpgr(ex1-19) variant leads to severe photoreceptor degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:5189-5201.
– Wrigstad A, Narfstrom K, Nilsson SE. Slowly progressive changes of the retina and retinal pigment epithelium in briard dogs with hereditary retinal dystrophy. A morphological study. Doc Ophthalmol 1994;87:337-354.
– Wrigstad A, Nilsson SE, Narfstrom K. Ultrastructural changes of the retina and the retinal pigment epithelium in briard dogs with hereditary congenital night blindness and partial day blindness. Exp Eye Res 1992;55:805-818.
– Yeh CY, Goldstein O, Kukekova AV, et al. Genomic deletion of CNGB3 is identical by descent in multiple canine breeds and causes achromatopsia. BMC Genet 2013;14:27.
– Zangerl B, Goldstein O, Philp AR, et al. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. Genomics 2006;88:551-563.
– Zangerl B, Wickstrom K, Slavik J, et al. Assessment of canine BEST1 variations identifies new mutations and establishes an independent bestrophinopathy model (cmr3). Mol Vis 2010;16:2791-2804.
– Zeiss CJ, Acland GM, Aguirre GD. Retinal pathology of canine X-linked progressive retinal atrophy, the locus homologue of RP3. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40: 3292-3304.
– Zhang Q, Acland GM, Wu WX, et al. Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. Hum Mol Genet 2002;11:993-1003.
– Zhu L, Jang GF, Jastrzebska B, et al. A naturally occurring mutation of the opsin gene (T4R) in dogs affects glycosylation and stability of the G protein-coupled receptor. J Biol Chem 2004;279:53828-53839.
– Zobor D, Stanzial F, Kellner U, et al. Retinal structure and function in achromatopsia: the CNGA3 phenotype. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014;55:346.

CHINCHILLA LANIGERA MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DELLA PRESBIACUSIA, DELLE PATOLOGIE E DEI TRAUMI DELLA MEMBRANA TIMPANICA

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] *Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;*
[2] *Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino*

La presbiacusia

L'orecchio è diviso in tre parti: orecchio esterno, orecchio medio e orecchio interno. Le onde sonore entrano nell'orecchio esterno e colpiscono il timpano, facendolo vibrare. Dietro il timpano, nell'orecchio medio, ci sono tre ossicine: il martello, l'incudine e la staffa. Le vibrazioni passano dal timpano a queste ossicine, che trasmettono le vibrazioni alla coclea, nell'orecchio interno. La coclea converte le vibrazioni sonore in segnali che vengono inviati lungo il nervo uditivo, al cervello.

Presbiacusia (dal greco *presbys* "anziano" + *akousis* "udire"), o ridotta capacità di sentire, è la diminuzione delle facoltà uditive causate principalmente dall'invecchiamento: oltre i 55-60 anni, la membrana timpanica diventa meno elastica: colpita dalle onde sonore, vibra di meno e trasmette con minore elasticità ed efficienza a martello, incudine e staffa le vibrazioni causate dal rumore. Le cause di presbiacusia sono diverse, oltre all'età, che è la principale, con gli anni, le cellule ciliate e le cellule nervose, fondamentali per la percezione uditiva, perdono di funzionalità e si riducono numericamente. Altre cause, meno comuni, della perdita dell'udito negli anziani comprendono gli esiti delle infezioni e delle lesioni del timpano e dell'orecchio interno. La presbiacusia è un'ipoacusia neurosensoriale progressiva bilaterale e simmetrica, inizialmente più accentuata nei confronti delle frequenze più elevate. La perdita progressiva dell'udito, che si accumula con l'età, ma è causata da fattori diversi rispetto al normale invecchiamento (fig. 1), non è presbiacusia propriamente detta, anche se può essere difficile differenziare gli effetti individuali di molteplici cause sulla perdita dell'udito.

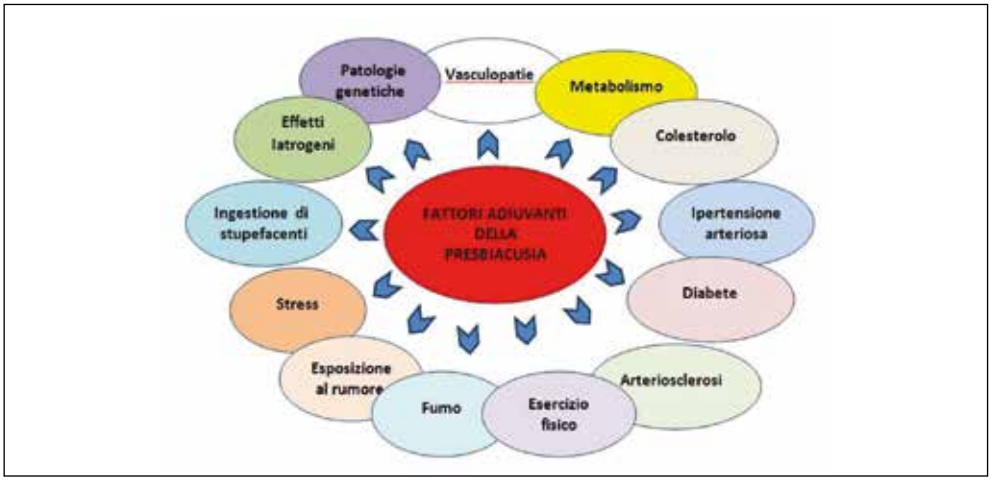


Fig. 1. Fattori adiuvanti dell'insorgenza della presbiacusia

Ci sono quattro tipi patologici di presbiacusia:

1) presbiacusia sensoriale: caratterizzata dalla degenerazione dell'organo del Corti (figg. 2A,2B);
2) presbiacusia neurale: caratterizzata dalla degenerazione delle cellule del ganglio spirale (fig. 2B);
3) presbiacusia striale/metabolica: caratterizzata da atrofia della *stria vascularis* (fig. 2B) in tutti i giri della coclea (fig. 2A);
4) presbiacusia cocleare-conduttiva: causata da irrigidimento della membrana basilare della coclea (figg. 2A,2B), che ne influenza il movimento vibratorio.

Non bisogna dimenticare che anche le delicate strutture dell'orecchio esterno e medio possono perdere la loro originaria funzionalità, contribuendo a un progressivo peggioramento della capacità uditiva, tanto che molte persone neppure si accorgono che il proprio udito sta diminuendo.

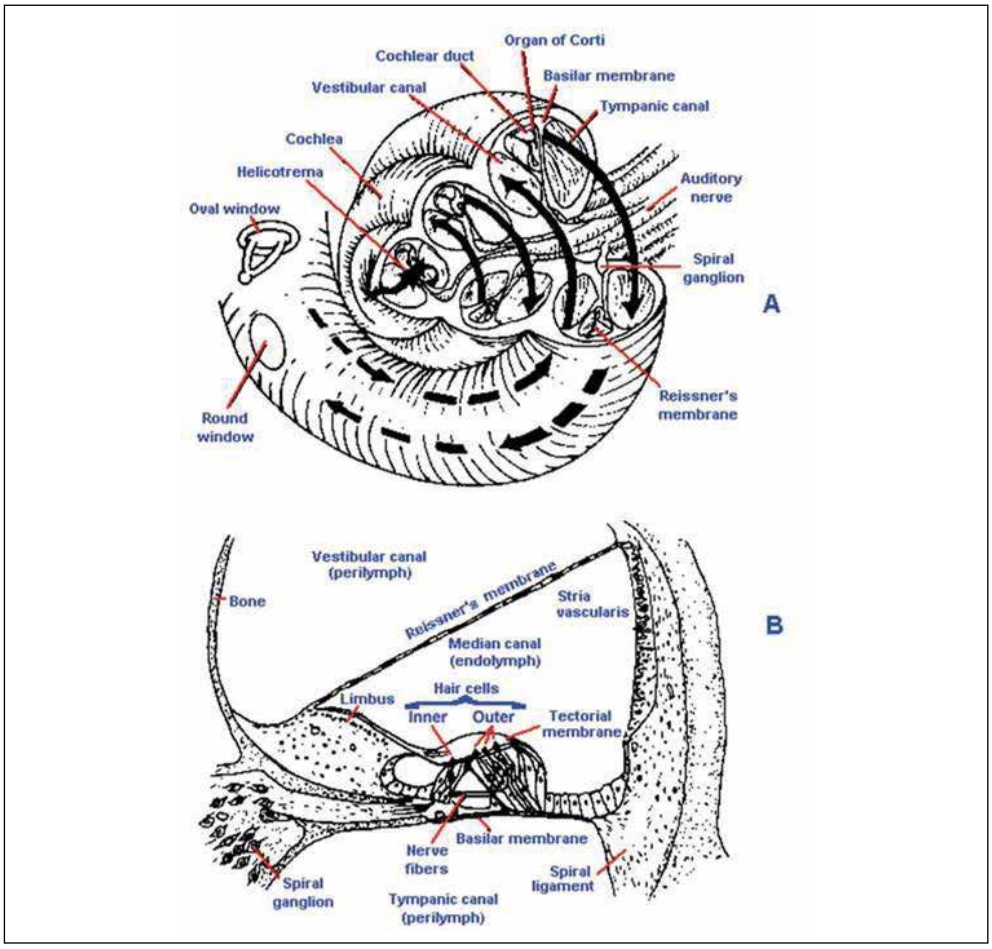


Fig. 2. Orecchio interno. A: coclea con organo del Corti (OC) nel canale cocleare. B: sezione trasversale dell'organo del Corti (OC): ganglio spirale, stria vascularis, membrana basilare (da: Wikipedia)

Fig. 3. *Chinchilla lanigera* (da: pinterest.com)

***Chinchilla lanigera* modello per lo studio della presbiacusia dovuta all'invecchiamento (fig. 3)**

Le ricadute funzionali dell'invecchiamento sul declino della funzione uditiva (presbiacusia) sono state studiate in due modelli di roditori ben caratterizzati e predittivi per l'uomo: il gerbillo della Mongolia (*Meriones unguiculatus*) e il topo (*Mus musculus*, ceppo C57BL). Ma è difficile, se non impossibile, valutare, nello studio dell'eziologia della presbiacusia in modelli murini di uso corrente, l'entità della componente dovuta all'accumulo del danno tempo-correlato (invecchiamento) *vs* quella tempo-indipendente, dei processi degenerativi innescati geneticamente, o di altri fattori.

Una specie in grado di fornire informazioni utili sul ruolo dell'invecchiamento cronologico, nell'insorgenza e progressione della presbiacusia, è proprio il cincilla (specie roditrice di non consanguinei) che, come il gerbillo, ha un *range* acustico simile a quello umano (20 Hz÷20 kHz) ma, a differenza di altri roditori, ha un'aspettativa di vita relativamente lunga. Infatti, sebbene l'aspettativa media di vita del cincilla non sia stata scientificamente determinata, a differenza dei roditori di laboratorio che hanno vita breve come il gerbillo (3-4 anni) e il topo (1,5-3 anni), non ci sono dubbi che nel cincilla superi gli 8 anni: per alcuni ricercatori, è di 8-12 anni, per altri di 12-15 o di 15-20. Così, il cincilla rappresenta un'opportunità eccezionale per studiare l'influenza di fattori endogeni ed esogeni legati all'invecchiamento cronologico (McFadden, 1997).

Partendo da queste premesse, è stata condotta una ricerca su 21 cincilla dell'età di 10-15 anni e su 23 soggetti giovani di controllo. Le soglie uditive sono state determinate da potenziali uditivi evocati (EVP, valutano la funzionalità del tronco cerebrale in risposta a determinati stimoli uditivi), e la funzionalità delle *outer hair cells* (OHC), disposte in tre file sul lato

esterno della galleria spirale o tunnel del Corti (fig. 4), è stata valutata misurando le *distortion product otoacoustic emissions* DPOAE) alla frequenza 2f1–f2 (con f1<f2, *cubic difference distortion product*). La perdita delle OHC e la patologia macroscopica della *stria vascularis* (fig. 4, epitelio stratificato che riveste la parete esterna del dotto cocleare) sono state valutate nelle coclee di 6 cincilla di 11-12 anni. I risultati mostrano un lieve, ma significativo, declino della sensibilità uditiva e del funzionamento delle OHC tra i 3 ed i 15 anni di età, con perdite delle alte frequenze, superiori e più rapidamente crescenti, delle perdite delle basse frequenze. In confronto a roditori meno longevi, la velocità di perdita della sensibilità uditiva del cincilla è più simile a quella dell'uomo, confermando la validità di questo modello animale per comprendere l'eziopatogenesi della presbiacusia umana (McFadden, 1997).

Le alterazioni morfologiche causate dall'invecchiamento sono state studiate in preparazioni piane delle coclee di 80 cincilla di età compresa tra la prematurità e i 19,2 anni. In queste coclee, sono state trovate 3 delle 4 forme di presbiacusia umana descritte da Harold F. Schuknecht (1961). Tutti gli animali (100%) presentavano perdita delle OHC sensoriali (presbiacusia sensoriale); IHC (*inner hair cells*, fig. 4) e OHC risultavano degenerate, a tassi di circa lo 0,29 e l'1%/anno, rispettivamente. La degenerazione dei pilastri interni (PI) ed esterni (PE) (fig. 5) dell'OC, legata all'età, si è verificata a un ritmo molto più lento. In 4 animali (5%) i processi dendritici nelle cellule di alcuni dei gangli spirali (fig. 2B) risultavano degenerati in aree dove la perdita di cellule sensoriali era minima (presbiacusia neurale, cellule del ganglio di Corti e nuclei centrali). Sei cincilla (7,5%) presentavano regioni di degenerazione della *stria vascularis* (presbiacusia striale). L'altro reperto comune alle coclee dei cincilla più vecchi era la presenza di lipofuscina, o pigmento dell'invecchiamento (accumulo granulare di molecole polimeriche, non degradabili dalle idrolasi lisosomiali, né eliminabili per esocitosi), i cui depositi erano accumulati nella regione sub-cuticolare delle OHC, dei PI e PE, vicino alle superfici endolinfatiche di molte delle cellule di supporto e nelle cellule

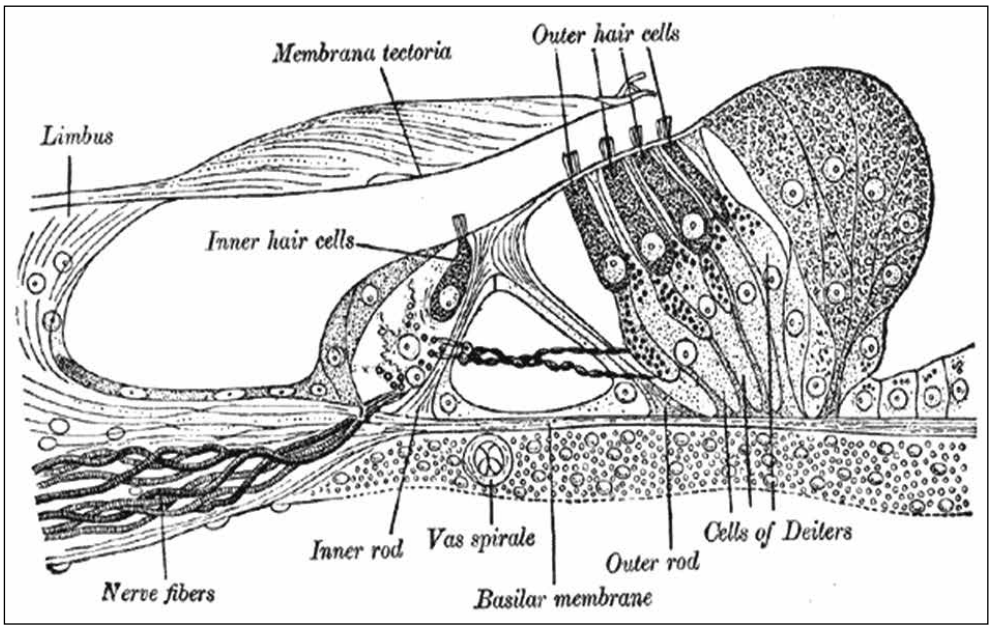


Fig. 4. Organo del Corti con cellule capellute interne ed esterne (da: Wikipedia)

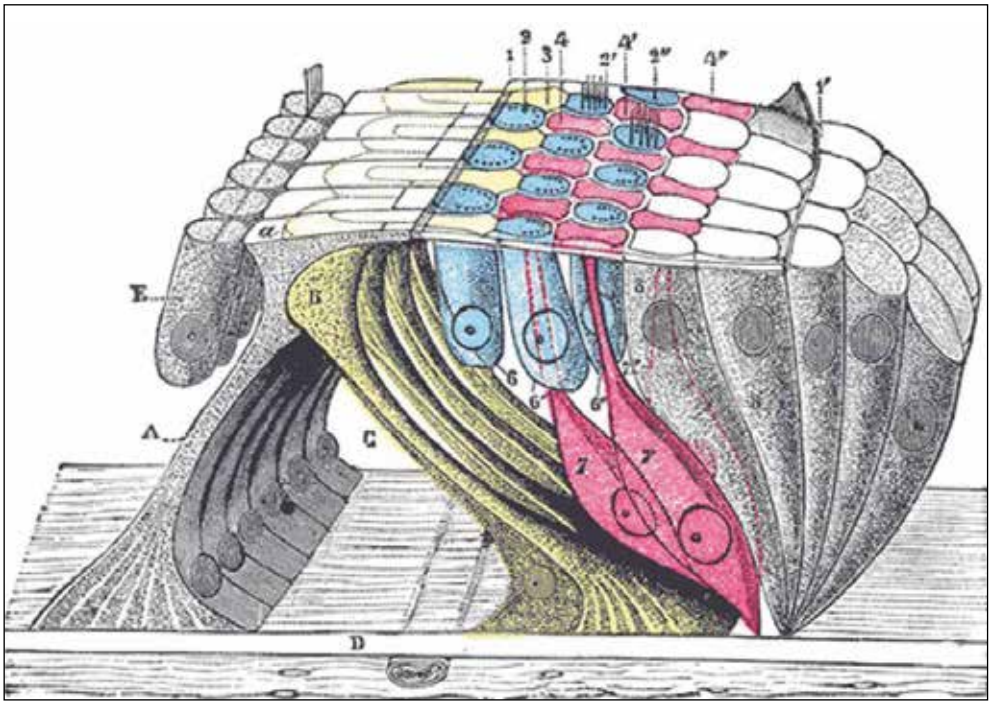


Fig. 5. Sezione dell'organo spirale del Corti: lamina reticolare e strutture adiacenti. A) Pilastri interni e a) la loro parte apicale, B) Pilastri esterni (in giallo), C) Galleria di Corti, D) Membrana basilare, E) Cellule acustiche interne, 1) Bordi interno ed esterno della membrana reticolare, 2) Cuticole delle cellule acustiche esterne (in blu), 3 e 4) Falangi delle cellule di Deiters (in rosso), 6) Cellule acustiche esterne (in blu), 7) Cellule di Deiters (in rosso), 8) Cellule di Hensen e Claudius (da: wikipedia)

epiteliali della membrana vestibolare di Reissner (nell'OC, separa la *scala media*,o canale mediano, dalla *scala vestibuli,* o canale vestibolare (figg. 2A,2B) e crea, con la membrana basilare, un compartimento nella coclea pieno di endolinfa, importante per il funzionamento dell'OC (fig. 2B). Nelle IHC gli accumuli di lipofuscina risultavano molto meno importanti.

Questi risultati suggeriscono che alcuni dei danni rilevati nelle coclee di persone adulte possono essere causati dall'invecchiamento sommato all'esposizione a uno o più agenti ototraumatici (Bohne, 1990).

Chinchilla lanigera, modello animale per lo studio di patologie della membrana timpanica

Vari modelli animali con perforazione acuta della membrana del timpano (PAMT) sono stati impiegati in ricerche sulla cura e ricostruzione della membrana timpanica (MT). Un problema di fondo di questi modelli è che le PAMT cicatrizzano/guariscono spontaneamente negli animali e, sovente, anche nell'uomo. Questi modelli non sono del tutto riconducibili all'aspetto preminente della patologia umana, rappresentato dalla PAMT di lunga durata. Il modello animale

ideale, per questi studi, deve avere una PAMT permanente, ben epitelizzata, senza infezioni e deve essere subtotale, per preservare un margine di membrana per interventi sperimentali.

Da oltre vent'anni, il cincilla è modello animale robusto, con un breve, ampio canale uditivo e MT relativamente ampia. La miringotomia termica (procedura chirurgica con la quale si produce una sottile incisione nella MT), seguita dal ripiegamento mediale dei microlembi della lesione, esita, nel modello cincilla, in una perforazione permanente, subtotale e cronica.

Da 19 cincilla (38 MT) sono state ottenute PAMT subtotali croniche in 32 orecchie (84% di successo), 6-8 settimane dopo la miringotomia. Infezioni persistenti o rigenerazione della MT, nonostante riperforazione, sono state registrate in 6 orecchie (16% di fallimenti).

Il modello cincilla è di uso corrente nella valutazione di vari supporti/matrici discoidali di biomembrane impregnate di fattori di crescita ricombinanti, nella rigenerazione di una MT con perforazione cronica non infettata, in modo che possa tornare a vibrare fisiologicamente (Amoils,1992).

Nell'otite media effusiva[1] (OME), o catarrale siero-mucosa, si ha un accumulo di essudato non purulento nella cassa timpanica, a ridosso della MT, che può comportare un'ipoacusia di 30-40 dB, causando una perdita di conduzione dell'udito (PCU) dal meccanismo non ancora del tutto chiarito. Tra le possibili cause, l'alterata elasticità acustica della MT, l'inefficiente movimento della catena degli ossicini dell'udito (martello, incudine, staffa), l'inadeguata *compliance* del complesso finestra ovale-staffa pedale o l'alterato *input* alle finestre ovale (del vestibolo) e rotonda (della coclea) (fig. 2A), dovuto alla conduzione dell'energia sonora attraverso il fluido dell'orecchio medio.

Recentemente, è stato studiato il contributo della vibrazione della MT e della velocità dell'umbone (VU, l'umbone è il punto più infossato della MT) alla PCU causata da versamento nell'orecchio medio. Le risposte VU e microfonica cocleare (CM) sono state misurate simultaneamente nel cincilla, usando *sinusoidal tone pip stimuli* (125 Hz-12 kHz), prima e dopo aver riempito l'orecchio medio con vari volumi (0,5-2 mL) di olio di silicone (viscosità dinamica 3,5 Poise). Sono stati osservati innalzamenti della soglia della CM di 20-40 dB e simultanee diminuzioni di 15-35 dB della VU, finché l'intera cavità dell'orecchio medio non è stata riempita con 1 o più mL di fluido. La timpanometria clinica standard di 226 Hz non ha registrato alterazioni, nelle soglie della CM associate al fluido, finché l'intera cavità dell'orecchio medio non è stata riempita completamente di fluido (1,5 mL). I cambiamenti della VU, delle soglie CM e della timpanometria, causati da un'OME indotta sperimentalmente, suggeriscono che la PCU insorga soprattutto come risultato di un'alterata mobilità della MT e del movimento dell'umbone accoppiato alla MT, oltre ad altri meccanismi all'interno dell'orecchio medio (Tornton, 2013).

Note

Nota 1 - L'otite media effusiva (OME) si definisce come un versamento endotimpanico senza segni di flogosi acuta. L'OME può insorgere sia come esito di un'otite media acuta, sia in modo non temporalmente correlato a un episodio infettivo. Si definisce "OME cronica" la persistenza di versamento endotimpanico per un periodo superiore alle 12 settimane.

Bibliografia

- Amoils, C. P, Jackler, R. K., Milezuk, H., Kelly, K. E., Cao, K., 1992; An animal model of chronic tympanic membrane perforation, Otolaryngology - Head and Neck Surgery, vol. 106: pp. 47-55
- Bohne, B. A., Gruner, M. M., Harding, G. W., 1990; Morphological correlates of aging in the cincilla cochlea, Hearing Res., vol. 48: pp. 79-91
- McFadden, S. L., Campo, P, Quaranta, N., Henderson, D., 1997; Age-related decline of auditory function in the chinchilla (*Chinchilla laniger*). Hearing Research, vol. 111: pp. 114-126
- Thornton, J. L., Chevallier, K. M., Koka, K., Gabbard, S. A., Tollin, D. 2013; Conductive hearing loss induced by experimental middle-ear effusion in a chinchilla model reveals impaired tympanic membrane-coupled ossicular chain movement, J. Assoc. Res. Otolaryngol., vol. 14: pp. 451-464

OCTOPUS VULGARIS E *NOTHOBRANCHIUS FURZERI*, MODELLI ANIMALI DI NEUROGENESI ADULTA E DI MODULAZIONE DELLA GLIOSI NELL'INVECCHIAMENTO, E *SEPIA OFFICINALIS*, MODELLO DI MATURAZIONE GANGLIARE ASINCRONA E RITARDATA DURANTE LA NEUROGENESI EMBRIONALE

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

La neurogenesi adulta

La neurogenesi adulta è il processo grazie al quale nuove cellule nervose vengono generate e si differenziano nel sistema nervoso di un individuo adulto. Solitamente, ha luogo in nicchie neurogeniche, nelle quali si forma un microambiente ideale per la proliferazione cellulare.

Non è bastato un secolo per confutare, dati alla mano, il dogma della neurobiologia, che considerava il cervello adulto incapace di processi neurogenici. Le prime dimostrazioni, ottenute con tecniche autoradiografiche (^{3}H-bromodesossiuridina), che nel cervello esistono cellule proliferanti, risalgono agli anni '60 del secolo scorso, ma non hanno fornito informazioni sulla tipologia di queste cellule. Nei primi anni '90 del secolo scorso è stato confermato che nel sistema nervoso centrale (SNC) ci sono cellule che proliferano e, a metà dello stesso decennio, queste cellule, isolate e messe in coltura, si sono rivelate vere e proprie cellule staminali, che andavano incontro alle due linee di differenziamento tipiche del SNC: neuronale e gliale. Queste cellule, isolate e messe in coltura, formavano specie di neurosfere che, indotte a differenziarsi, diventavano neuroni o astrociti e oligodendrociti.

Col tempo, Altman e Gage individuarono, nella zona sub-granulare del giro dentato dell'ippocampo (regione dell'apprendimento e della memoria) e nella zona sub-ventricolare dei ventricoli laterali (formazione di nuovi neuroni a livello dei bulbi olfattivi) le regioni nelle quali la neurogenesi adulta era più intensa (Kempermann, 2006). Nella regione sub-ventricolare ci sono cellule ependimali[1] alcune delle quali, probabilmente, funzionano da cellule staminali neuronali (fig. 2). Queste cellule si attivano e si muovono lungo una via chiamata "corrente migratoria rostrale" e colonizzano le regioni del bulbo olfattivo, dove ricevono segnali di in-

Fig. 1. *Octopus vulgaris* (da: zorafina.wordpress.com)

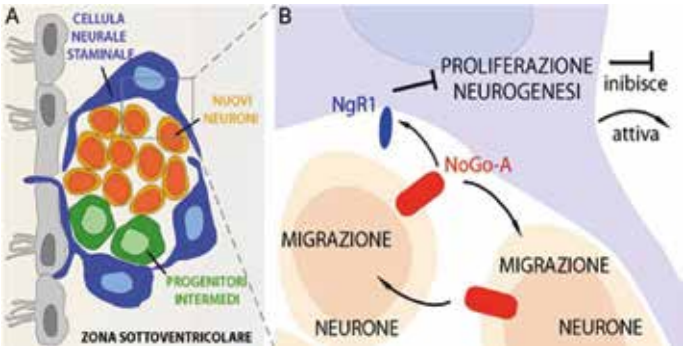


Fig. 2. Cellule neurali staminali adulte nella zona sottoventricolare (da: Rolando, R., Buffo, C., 2012; NoGo-A e il suo recettore NgR1 regolano l'attività delle cellule staminali neurali e la produzione di nuovi neuroni nel sistema nervoso adulto)

duzione al differenziamento neuronale, che le faranno diventare veri e propri neuroni dei bulbi olfattivi. Nell'ippocampo ci sono cellule che funzionano da staminali e si muovono dalla regione del giro dentato allo strato granulare sottostante, portando al differenziamento i neuroni e favorendo la formazione di astrociti.

La neurogenesi adulta è un processo influenzato da vari fattori intrinseci (ormoni steroidei e fattori di crescita) ed estrinseci (apprendimento, arricchimento dell'ambiente circostante e stimoli sensoriali), ed è stata riscontrata in organismi che presentano un'elevata complessità strutturale e funzionale del SNC, quali pesci, rettili, uccelli e mammiferi, uomo compreso e, tra gli invertebrati, crostacei, ottopodi, decapodi e insetti.

Poiché, sia negli invertebrati che nei vertebrati, la neurogenesi adulta si realizza in aree che presentano un elevato grado di plasticità strutturale, coinvolte con un ruolo centrale nell'apprendimento, nella memoria e nell'integrazione di stimoli sensoriali, si pensa che il processo di neurogenesi sia indispensabile per il supporto delle capacità cognitive più evolute.

Sono almeno tre le principali finalità delle ricerche sulla neurogenesi adulta: 1) capire la/le sua/e funzione/i nel cervello sano e in quello patologico; 2) comprenderne il ruolo e il coinvolgimento in varie patologie neurodegenerative, in disturbi di sviluppo alterato e/o in stati d'ansia, di depressione o di disturbo bipolare e 3) sfruttare la/le capacità interna/e del cervello umano per curare, con strategie rigenerative, patologie neurologiche accomunate da un processo cronico e selettivo di morte cellulare dei neuroni, come i morbi di Alzheimer e di Parkinson, la corea di Huntington, la sclerosi amiotrofica laterale e le lesioni cerebrali da traumi e ictus.

Questo articolo è dedicato a tre modelli animali: il primo è in un cefalopode, *Octopus vulgaris*, modello di neurogenesi adulta; il secondo modello animale è in un pesce teleosteo, *Nothobranchius furzeri* (fig. 3), per lo studio della neurogenesi adulta e della gliosi nell'invecchiamento; *Sepia officinalis* (fig. 4) è il *test system* del terzo modello animale, per lo stu-

Fig. 3. *Nothobranchius furzeri* (da: nothobranchius.info)

Fig. 4. *Sepia officinalis* (da: guiaremediosnaturales.com)

dio dell'espressione genica durante la maturazione gangliare ritardata e asincrona, nel corso della neurogenesi embrionale.

Octopus vulgaris, modello animale per lo studio della meurogenesi adulta

Il sistema nervoso dei cefalopodi presenta numerose innovazioni sensoriali e strutturali rispetto agli altri molluschi. Il loro sviluppato SNC (gangli fusi in un cervello) (figg. 5,6) è stato preso come modello di confronto con i vertebrati, mentre gli assoni giganti sono stati materiale biologico importante per la neurocitologia, l'elettrofisiologia e la biofisica. Molti sforzi sono stati fatti per capire le funzioni cerebrali degli assoni giganti[2], ma quasi nulla è stato tentato per chiarire le *pathway* molecolari che supportano il loro sviluppo. Similmente, le caratteristiche peculiari ed esclusive del SNC dei cefalopodi indicano elevati livelli di flessibilità e adattabilità, che ne fanno un importante modello biologico per studi evoluzionistici. Tuttavia, solo recentemente sono iniziati gli studi sul loro sviluppo e sui meccanismi che possono aver fatto emergere questi caratteri derivati. In particolare, per quanto riguarda le ricerche sulla neurogenesi adulta, il SNC di *Octopus vulgaris* è parso particolarmente adatto: è centralizzato, ha un'organizzazione strutturale e funzionale gerarchica, ha capacità cognitive avanzate e complesse abilità comportamentali. Grazie a queste caratteristiche, *Octopus vulgaris* (fig. 1), è modello ideale per lo studio della neurogenesi adulta (Di Cosmo, 2013).

Il Dipartimento di Biologia del Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo, dell'Università di Napoli Federico II, è uno dei centri di ricerca coinvolti nello studio della neurogenesi adulta, in particolare in *Octopus vulgaris*. Ricercatori di questo Centro hanno usato *Octopus* femmine e maschi adulti, della massa corporea media di ~800 g, stabulati in vasche di PVC alimentate con acqua di mare a circuito chiuso, con temperatura controllata. Subito pri-

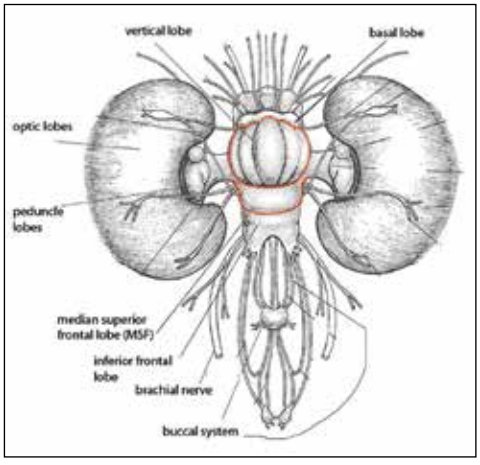


Fig. 5. Sistema nervoso di *Octopus vulgaris* (da: Carla Bertapelle, Dottorato di Ricerca, Università di Napoli Federico II)

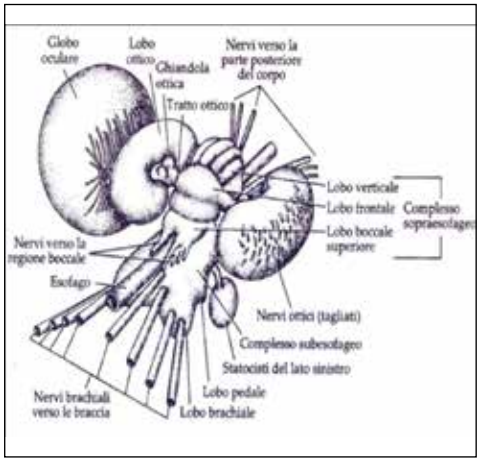


Figura 6. Sistema nervoso di *Octopus vulgaris* Sistema nervoso molto sviluppato con cefalizzazione estrema. La maggior parte dei gangli si è spostata in avanti e si è concentrata sotto forma di lobi (15) di un "cervello", racchiuso in un involucro cartilagineo ("cranio" o cartilagine cefalica) (da: slideplayer.it)

ma della fase sperimentale, gli *Octopus* sono stati profondamente anestetizzati con isofluorano. I cervelli, dissezionati in condizioni di sterilità, sono stati incubati *in vitro* con bromodeossiuridina (BrdU), un intercalante nucleotidico che viene incorporato nel DNA di neosintesi. Inclusi in paraffina, i cervelli sono stati sezionati al microtomo in sezioni sottili, poi reidratate e incubate con un anticorpo anti-BrdU, a 4°C per un'intera notte. Dopo abbondanti lavaggi, le sezioni sono state incubate, per 1 h a temperatura ambiente, con un anticorpo secondario biotinilato, poi incubate di nuovo con streptavidina coniugata con perossidasi, a temperatura ambiente per 1 h. Infine la reazione è stata rivelata con 3,3'-diaminobenzidina, cromogeno usato per colorazioni immuno-istochimiche e *immunoblotting* che, in presenza della perossidasi, produce un precipitato di colore marrone. Le aree del sistema nervoso positive all'anticorpo anti-BrdU erano localizzate nella massa sopraesofagea (fig. 5 e 6). In particolare, si osservavano strutture riconducibili a nicchie di cellule in proliferazione che si approfondavano nei neuropìli[3] dei lobi del sistema verticale-frontale (lobo verticale e lobo frontale mediale superiore), che è la sede dell'apprendimento e della memoria

Questi risultati supportano l'ipotesi che in *Octopus vulgaris* abbia luogo un processo di neurogenesi adulta (Di Cosmo, 2013).

Esperimenti comportamentali hanno dimostrato che un insieme di stimoli sensoriali e intellettivi inducono un aumento della neurogenesi adulta e hanno individuato e isolato, dal SNC di *Octopus*, un gene, appartenente alla famiglia *Elav*, che si è rivelato un ottimo marker della neurogenesi adulta (Bertapelle, 2015).

Nothobranchius furzeri, modello animale per lo studio della neurogenesi adulta e della gliosi nell'invecchiamento

Il secondo modello animale, oggetto di questo articolo, riguarda lo studio della neurogenesi adulta e della gliosi[4] nell'invecchiamento in un vertebrato, *Nothobranchius furzeri* (Jubb, 1971, *killifish*) (fig. 3), piccolo pesce teleosteo d'acqua dolce, aggressivo e cannibale, appartenente alla famiglia *Nothobranchiidae*, diffuso nella riserva del Gonarezhou National Park (Zimbabwe), dove abita acque leggermente acide di stagni, polle e paludi stagionali. Durante i periodi di siccità le uova fecondate rimangono nel fango secco, in attesa della stagione delle piogge. È una specie annuale a crescita molto veloce: una volta schiuse le uova, i pesci hanno a disposizione pochi mesi per crescere e riprodursi, prima che la stagione secca prosciughi il loro habitat.

L'aspettativa di vita media di questo pesce è di pochi mesi (circa 3 in laboratorio), tra le più brevi mai segnalate nei vertebrati. Grazie a questa caratteristica, *Nothobranchius furzeri* è modello animale particolarmente adatto per seguire l'evoluzione di specifici fenomeni biologici legati all'invecchiamento (a questo proposito, si vedano anche gli articoli di Rossi G. e di Salogni C. in questa sezione).

Il telencefalo di *Nothobranchius furzeri* presenta dati di attività proliferativa, in alcune regioni specifiche del telencefalo, simile a quella di *Danio rerio* (*Zebrafish*, Ciprinide), come sostanzialmente simili, nelle due specie, sono la distribuzione delle nicchie neurogeniche e le cellule staminali adulte, che generano neuroni e persistono nel cervello adulto. A differenza di *Zebrafish* tuttavia il genoma di *Nothobranchius furzeri* contiene il gene *doublecortin* (Dcx), che è espresso transientemente da neuroni di recente generazione nel telencefalo e nel Tetto Ottico.

E' stata effettuata, nei cervelli di *Nothobranchius furzeri* di 5 e di 25 settimane di età (~10 e 50% del ciclo vitale in natura, rispettivamente) l'analisi immunoistochimica della presenza di marcatori specifici di cellule gliali: *Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP) e *calcium-binding protein B* (S100β), di precursori neuronali (Musashi, Msh1) e di neuroni neo-differenziati (Doublecortin, Dcx). Le regioni studiate sono state il Tetto Ottico (mesencefalo) e il telencefalo, che nel pesce adulto mantengono, rispettivamente, una zona germinale e zone di attività proliferativa analoghe

alle nicchie neurogeniche dei mammiferi. Scopo dello studio è stato valutare eventuali cambiamenti dei *pattern* di espressione di questi 3 marcatori in funzione dell'invecchiamento. Inoltre l'analisi dell'espressione di due microRNA, miR-9 e miR-124, ha permesso di scoprire che hanno domini di espressione complementari: miR-9 è espresso nelle nicchie neurogeniche del telencefalo e nella glia radiale del Tetto Ottico, mentre miR-124 è espresso in neuroni differenziati.

I risultati di questa ricerca hanno evidenziato un decadimento della neurogenesi adulta in funzione dell'età. Usando stime stereologiche[5] obiettive (cioè non affette da bias) della numerosità cellulare, è stata registrata una diminuzione di 5 volte del numero delle cellule mitoticamente attive nel Tetto Ottico del cervello adulto, rispetto al cervello del pesce più giovane. Questo calo dell'attività mitotica era parallelo alla riduzione della marcatura Dcx. Ma il dato più significativo emerso da questa ricerca è una drammatica *up-regulation* della risposta gliotica nella glia radiale del Tetto Ottico nel cervello anziano, che si verifica con l'invecchiamento e che è evidenziata da un imponente aumento delle fibre GFAP+, non accompagnata da una parallela *up-regulation* degli altri due marker della glia radiale: S100β e Msh1.

Il *pattern* di espressione di S100β non ha mostrato cambiamenti sostanziali con l'invecchiamento ma, a differenza del pesce giovane (5 settimane), le fibre GFAP+ dell'animale più anziano (25 settimane) co-localizzavano perfettamente con tutte le fibre S100β, ed esclusivamente con queste. L'invecchiamento ha modulato, invece, l'espressione di Msh1: nei pesci di 5 settimane di età, le zone Msh1+ erano disposte lungo il margine ventricolare, mentre nei pesci di 25 settimane di età un secondo fronte di espressione si trovava in posizione più superficiale. Le cellule Msh1+ si mantenevano, comunque, distinte da quelle GFAP+, sebbene fossero strettamente a queste connesse. L'espressione di Dcx, marcatore dei neuroni neodifferenziati, è calata nettamente con l'invecchiamento.

Questi dati indicano che la riduzione della neurogenesi adulta, associata all'invecchiamento, è riconducibile a una riduzione dell'attività neurogenica delle cellule staminali neurali adulte (CSNA), piuttosto che alla loro riduzione numerica. Il termine "cellula staminale neurale" indica cellule del SNC, dotate non solo di capacità proliferativa, ma anche di capacità autorigenerativa e di multipotenzialità, intesa come capacità di generare i tre fenotipi cellulari neurali: astrociti, neuroni, oligodendrociti. La gliosi associata all'invecchiamento può essere considerata la risultante del raggiungimento di uno stato di differenziamento transiente da parte delle CSNA, che mantengono, però, il loro potenziale neurogenico e, quindi, la capacità di de-differenziamento, di tornare, cioè, a proliferare e a comportarsi da progenitori neurali.

In conclusione, un primo dato importante è la dimostrazione che la flessione negativa della neurogenesi con l'invecchiamento è riconducibile alla riduzione dell'attività neurogenica delle CSNA, piuttosto che alla loro riduzione numerica. Nel corso della vita adulta, le CSNA allungano progressivamente il ciclo cellulare, fino a uscirne per rimanere in uno stato di quiescenza non proliferativa (cellule PCNA-: *Proliferating Cell Nuclear Antigen* - antigene nucleare di proliferazione cellulare). Questa stato di quiescenza non si accompagna, però, alla perdita della staminalità, poiché viene conservata l'espressione di marcatori tipici come Msh1, lasciando supporre la capacità delle cellule Msh1+/PCNA- di rientrare nel ciclo cellulare e proliferare, sebbene non sia affatto scontato il salto logico che vorrebbe che, da tali divisioni, si generino neuroni piuttosto che altri tipi cellulari (Battistoni, 2011; Tozzini, 2012).

In conclusione, il cervello di *Nothobranchius furzeri* replica due *hallmark* tipici dell'invecchiamento dei mammiferi, gliosi e ridotta neurogenesi adulta, e questa caratteristica fa di questo pesce un modello animale predittivo per ricerche finalizzate a ottenere ricadute utili per lo studio di molte gravi patologie nervose umane, e per la ricerca e messa a punto di terapie innovative per la loro cura.

Maturazione gangliare ritardata e asincrona durante la neurogenesi in embrioni di *Sepia officinalis*, evidenziata dall'espressione di Sof-elav1

Tra i lofotrocozoi[6], la centralizzazione del sistema nervoso raggiunge il massimo livello di complessità nei cefalopodi, nei quali i tipici gangli dei molluschi si sviluppano molto e si fondono in lobi gerarchizzati. E' noto che i primordi gangliari emergono precocemente e simultaneamente durante l'embriogenesi, ma non esistono dati sul processo di differenziamento neurale in questo gruppo. E' stata fatta una ricerca sui geni della famiglia *elav/hu* in *Sepia officinalis*, perché sono tra i marker genetici più precoci delle cellule neurali post-mitotiche, non appena queste escono dal ciclo cellulare e iniziano a differenziarsi in neuroni. Questa funzione è stata evidenziata nei principali gruppi di metazoi.

Due paraloghi[7] della famiglia *elav/hu* sono stati identificati in *Sepia officinalis* (fig. 4) e l'espressione del paralogo più specificamente neurale, *Sof-elav1*, è stata caratterizzata durante l'embriogenesi. Sorprendentemente, è risultato che l'espressione di *Sof-elav1* non è né simile né coordinata in tutti i gangli prossimi alla formazione. In particolare, ambedue i gangli pallio-viscerali mostrano un'espressione precoce e massiva di *Sof-elav1* subito dopo la loro comparsa, indicando che la maggior parte delle loro cellule si differenziano in neuroni già in uno stadio precoce. Al contrario, altri gangli, in particolare i due gangli cerebrali (sopraesofagei), che contribuiscono alla maggior parte dei centri di apprendimento cerebrali, sono gli ultimi a mostrare sia un'ampia espressione ritardata di *Sof-elav1* che neuroni in corso di differenziamento. Le espressioni ritardate e asincrone nei gangli cerebrali suggeriscono che la maggior parte delle cellule gangliari ritardino il loro differenziamento, mantenendo le capacità proliferative.

Questo risultato contrasta con quanto dimostrato in molluschi meno evoluti, i gasteropodi, nei quali i gangli cerebrali e pedali sono i primi a differenziare neuroni, subito prima dei gangli viscerali. La differenza tra cefalopodi e gasteropodi può rappresentare una chiave di volta nella comprensione della peculiare evoluzione cerebrale dei cefalopodi (Buresi, 2013). Inoltre, questa evoluzione della tempistica di differenziamento può aiutare a spiegare lo sviluppo eccezionale della massa sopra-esofagea, generata dai gangli cerebrali, nei cervelli dei cefalopodi (fig. 5,6).

I risultati summenzionati dimostrano concordemente che la comparsa di modifiche morfologiche, e/o di caratteristiche derivate profondamente alterate, è inseparabile dalle modifiche potenziali dei geni coinvolti, sia dalla modifica del loro ruolo che dal *pattern* della loro espressione. Di conseguenza, nei cefalopodi i rapporti genici durante l'organogenesi sono diversi da quelli di altri metazoi, poiché dimostrano la diversità della *pathway* di regolazione e la plasticità di questi geni dello sviluppo (Navet, 2014).

In conclusione, questo modello animale in embrioni di *Sepia officinalis* per lo studio della maturazione gangliare ritardata e asincrona durante la neurogenesi, monitorata dall'espressione embrionale del gene Sof-elav-1, permette di trarre conclusioni sullo sviluppo e la fisiologia del sistema nervoso centrale dei cefalopodi, in una prospettiva evoluzionistica e comparata.

Note

Nota 1. Le cellule ependimali sono uno dei sei tipi cellulari della glia del sistema nervoso centrale. La loro morfologia è cubica/colonnare. Sulla superficie apicale presentano delle ciglia che hanno il compito di muovere il liquido cerebro-spinale nel sistema nervoso centrale. La stessa superficie apicale può anche essere caratterizzata, in alternativa alle ciglia, da microvilli, che facilitano l'assorbimento del liquido cerebrospinale permettendone il ricambio. All'interno dei ventricoli cerebrali, alcune cellule ependimali modificate rivestono capillari sanguigni ripiegati e in comunicazione tra loro, formando il plesso corioideo, il quale produce il liquido cerebro-spinale.

Nota 2. L'assone gigante degli ottopodi è la cellula nervosa più grande che si conosca nel regno animale. Può raggiungere fino a 1 mm di diametro e quasi un metro di lunghezza. L›assone fa parte del sistema di propulsione del calamaro e si estende dal ganglio ai muscoli, trasmettendo dei segnali che controllano e coordinano il movimento. La cavità del mantello del calamaro, in generale, è piena d›acqua di mare, ma la contrazione coordinata dei muscoli, agendo da sistema di propulsione, fa sì che l›acqua venga espulsa come idrogetto, dando al calamaro una spinta propulsiva che gli fa percorrere anche 10 m/s.

Nota 3. In neuroanatomia, il neuropilo è la regione compresa tra i vari corpi cellulari (pirenofori) dei neuroni della sostanza grigia dell'encefalo e del midollo spinale. Consiste in un denso intreccio di terminali assonici, dendriti e processi delle cellule gliali (astrociti e oligodendrociti); comprende anche le connessioni sinaptiche tra le ramificazioni assoniche e i dendriti.

Nota 4. Gliosi, processo riparativo che consegue alla distruzione delle cellule nervose, consiste in un tessuto sostitutivo caratterizzato dalla trasformazione della glia in glia fibrillare, con prolungamenti sottili e apparato fibrillare sviluppato. Tutte le cellule della glia possono essere interessate nel processo di gliosi: astrociti, oligidendrociti, cellule ependimali. Cause della gliosi sono: invecchiamento cerebrale fisiologico, esiti di lesioni vascolari (emorragiche, infartuali), distruzione dei neuroni corticali per malattie neurodegenerative come le demenze, esiti di encefaliti, diabete, sclerosi multipla, encefalopatie spongiformi trasmissibili, traumi, necrosi della sostanza bianca esposta a raggi, malattie da accumulo di sostanze patologiche dentro i neuroni. Le cause flogistiche e ischemiche provocano anche ispessimento delle meningi sovrastanti il processo gliotico.

Nota 5. Il conteggio delle cellule in una regione di interesse, con la stereologia, fornisce dati quantitativi affidabili che possono essere usati per stabilire se il numero delle cellule differisce tra i gruppi trattati e il gruppo di controllo. *L'Optical Fractionation Probe* è lo strumento stereologico usato per contare le cellule. L'*Optical Systematic Random Sampling* è usato nell'*Optical Fractionator Method* per ottenere un campione statisticamente valido della regione di interesse. Il *disector*, grafico di un cubo o rettangolo in 3D, indica i punti del campione e le aree dove contare le cellule.

Nota 6. I lofotrocozoi, benché raggruppati in base a dati molecolari, prendono il nome dall'apparato d'alimentazione (lofòforo) di alcuni *phyla* del gruppo, nonché dalla larva trocòfora presente nei Molluschi e negli Anellidi. Questo clade comprende: Platelminti, Molluschi, Anellidi e molti altri *phyla*.

Nota 7. Paralogo: gene correlato a un altro gene, in uno stesso organismo, per discendenza da un unico gene ancestrale, che è stato duplicato e che può avere differente sequenza di DNA e differente funzione biologica.

Bibliografia

- Battistoni, G., (2011); Neurogenesi nell'adulto e modulazione della gliosi in funzione dell'invecchiamento: studio nel pesce annuale Nothobranchius furzeri. Facoltà di SMFN, CdL in Scienze Biologiche Molecolari, Università di Pisa
- Bertapelle C. (2015); Il sistema nervoso di Octopus vulgaris come modello di studio della neurogenesi adulta. Tesi di Dottorato, Dpt. Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, 10.6092/UNINA/FEDOA/10173
- Buresi, A., Canali, E., Bonnaud, L, and Baratte, S., (2013); Delayed and asynchronous ganglionic maturation during cephalopod neurogenesis evidenced by Sof-elav1 expression in embryos of Sepia officinalis (Mollusca, Cephalopoda). Journal of Comparative Neurology, , Vol. 521: pp. 1482-1496
- Di Cosmo, A., Bertapelle C., Polese G. (2013); Il sistema nervoso di Octopus vulgaris come modello di studio della neurogenesi adulta. Atti della Società Naturalisti e Matematici di Modena, vol. CXLIV
- Kempermann, G., (2006); Adult neurogenesis. Stem Cells and Meuronal development in the Adult Brain. Oxford University Press

– Navet, S., Baratte, S., Bassaglia, Y., Andouche, A. Buresi, A., and Bonnaud, L., (2014); NEUROGENESIS IN CEPHALOPODS: "ECO-EVO-DEVO" APPROACH IN THE CUTTLEFISH SEPIA OFFICINALIS (MOLLUSCA-CEPHALOPODA). Journal of Marine Science and Technology, Vol. 22, No. 1, pp. 15-24
– Tozzini, E. T., Baumgart, M., Battistoni, G. and Cellerino, A. (2012), Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. Aging Cell, 11: 241–251

L'AFRICAN TURQUOISE KILLIFISH, *NOTHOBRANCHIUS FURZERI* (JUBB, 1971), COME MODELLO OTTIMALE PER LO STUDIO DEI PROCESSI DI INVECCHIAMENTO NELL'UOMO

CRISTIAN SALOGNI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER), sezione di Brescia

L'invecchiamento è un processo naturale e inevitabile, che implica un progressivo decadimento delle funzionalità dell'organismo unitamente ad un aumento del rischio di sviluppare certe malattie fino ad arrivare alla morte. I meccanismi biologici che regolano questo fenomeno sono comuni a tutti gli esseri viventi e implicano, con modalità e tempi diversi, l'accumulo progressivo di danni cellulari assieme ad una minore efficienza dei sistemi enzimatici riparativi (Kirkwood e Austad, 2000; Lopez-Otin *et al*., 2013).

L'invecchiamento nell'uomo si associa ad alcuni cambiamenti evidenti quali l'imbiancamento e la perdita dei capelli, la comparsa delle rughe, la perdita di massa muscolare, la minor resistenza fisica nonché l'aumentata incidenza di malattie come l'infarto miocardico, l'ictus, il cancro, il diabete di tipo 2 e le malattie neurodegenerative (*Akushevich et al*., 2013; Brody e Grant, 2001; Craig *et al*., 2015). Se è vero che i processi di invecchiamento sono progressivi è anche vero che in alcuni soggetti sono più lenti che in altri. In opposizione si hanno vere e proprie patologie note come "Human progeroid syndromes", dove si assiste a un drammatico, quanto precoce, invecchiamento dell'organismo. Questi fenomeni dipendono da precise mutazioni del DNA (Burtner e Kennedy, 2010; Eisenstein, 2012).

La velocità dell'invecchiamento dipende dall'interazione di componenti genetiche (soggettive o di popolazione) e dallo stile di vita. Sebbene siano stati eseguiti numerosi studi nelle popolazioni caratterizzate dall'elevata frequenza di ultracentenari, non è mai stato possibile chiarire completamente il ruolo assunto dai fattori genetici piuttosto che da quelli ambientali (alimentazione, attività fisica e mentale, tipo di lavoro, esposizione a contaminanti ambientali, ecc.). Da qui la necessità di poter ricorrere a un modello alternativo a quello umano, meglio gestibile e indagabile nelle condizioni controllate di laboratorio.

Seguendo tale necessità, il primo approccio è stato rivolto alle linee cellulari di derivazione umana coltivate *in vitro* (de Magalhaes, 2004). Queste hanno però subito mostrato un grosso

Fig. 1: Esemplare maschio di African turquoise killifis (*Nothobranchius furzeri*) (Jubb, 1971) (Da: Wikipedia)

limite. Le osservazioni possono essere infatti effettuate esclusivamente a livello cellulare e non a un livello biologico superiore dove tessuti, organi e apparati sono coinvolti. La conseguenza è stata quella di individuare un modello animale ottimale; ovvero un organismo così complesso da poter essere paragonato all'uomo ma al contempo abbastanza semplice da poter essere mantenuto e studiato in condizioni sperimentali. In tale ambito sono state individuate alcune specie sia tra gli invertebrati (lieviti, nematodi e insetti) la cui vita media dura pochi giorni, sia tra i vertebrati (topi e pesci) che possono vivere più anni.

Entrando più nel dettaglio dei modelli invertebrati troviamo il lievito *Saccharomyces cerevisae* (Sinclair e Guarente, 1997; Herker *et al*., 2004; Verduyckt *et al*., 2016). Questo microrganismo eucariote ha il vantaggio di avere un numero ridotto di replicazioni durante il proprio ciclo vitale. Il numero di cellule figlie generate è quindi usato come parametro diretto del grado di invecchiamento delle cellule madre (Replicative Lifespan - RLS). Un altro parametro considerato è il tempo di sopravvivenza delle cellule di una coltura in fase non replicativa (Chronological lifespan - CLS) (Longo *et al*., 1996; Herker *et al*., 2004; Kaeberlein, 2010). Sul lievito sono stati effettuati soprattutto studi inerenti la restrizione alimentare (DR – Dietary Restriction), intesa come ridotto apporto alimentare e non come malnutrizione. Si è dimostrato che la DR incrementa sia il RLS sia il CLS. I lieviti sono stati anche utilizzati nello studio di malattie neurodegenerative come la Malattia di Parkinson e di Alzheimer. Sembra infatti che siano coinvolti, oltre a geni specie-specifici umani, anche alcuni geni condivisi (geni conservati) (Cooper *et al*., 2006; Khurana e Lindquist, 2010).

Un altro organismo invertebrato utilizzato nei primissimi studi sull'invecchiamento negli anni '70 del secolo scorso è il verme tondo *Caenorhabditis elegans*. Questo nematode, della lunghezza di circa un millimetro e dal ciclo vitale di poche settimane, presenta l'indubbio vantaggio, rispetto al lievito, di una maggiore complessità. Si tratta infatti di un organismo pluricellulare, dotato di tessuti e apparati. Un altro vantaggio di *C. elegans* è la possibilità di manipolazione genetica. Attraverso tale via è stato infatti possibile valutare la risposta di diverse linee genetiche, corrispondenti ad altrettante mutazioni, ai più disparati agenti stressanti (Klass, 1983; Wong *et al*., 1995; Yang e Wilson, 2000). I parametri più comunemente misurati sono la riduzione della motilità e la minor assunzione di alimento. Tali indici crescono proporzionalmente al danno del DNA (Collins *et al*., 2008).

Il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* si è dimostrato, grazie alle profonde conoscenze maturate in ambito scientifico nell'ultimo secolo, un altro importante modello di studio. La forma selvatica di *D. melanogaster* può vivere un numero di giorni ben definito in condizioni di laboratorio. Tale valore può tuttavia essere modificato da numerosi fattori ambientali. Le numerose linee genetiche di drosofila disponibili consentono inoltre di ottenere buoni risultati di ripetibilità e riproducibilità nelle prove sperimentali. Si deve aggiungere che, sebbene sia i vermi tondi sia i moscerini della frutta siano ugualmente correlati ai vertebrati (Masoro e Austad, 2006) è anche vero che le drosofile hanno delle caratteristiche che le rendono più apprezzabili. Con quest'ultime infatti è possibile lo studio di strutture assenti nei vermi, come il sistema nervoso centrale, il cuore e le cellule staminali (Ocorr *et al*., 2007; Demontis e Perrimon, 2010; Guo *et al*., 2014; *Haddadi et al*., 2014).

Infine possiamo dire che lo studio degli invertebrati è utile e vantaggioso sia per motivi puramente pratici (facilità di riproduzione e allevamento delle specie in laboratorio, facilità di manipolazione genetica, elevato numero di soggetti e generazioni disponibili, assenza di restrizioni etiche nella sperimentazione) sia scientifici (studi sui meccanismi intracellulari e biochimici di base, implicati nei processi di invecchiamento comuni a tutti gli animali). Tuttavia tali modelli non potranno mai dare quelle informazioni che solo un modello animale più complesso può fornire. Ne sono esempi i processi di cancerogenesi età-dipendenti, i fenomeni di senescenza per tutti quegli apparati e sistemi assenti negli invertebrati (p. es. sistema schele-

trico) oppure diversamente sviluppati (p. es. sistema immunitario) (Ethan e McGinnis, 2004).

Tra i modelli vertebrati troviamo il topo e alcuni pesci.

Il topo di laboratorio (*Mus musculus*) è sicuramente l'animale che, almeno inizialmente, è stato più utilizzato. Questo mammifero presenta infatti un'elevata conservazione con l'uomo dei meccanismi fisiologici di invecchiamento. Esistono almeno 32 diverse linee mutanti di topo utilizzate per tali ricerche. La più comunemente usata è la C57BL/6, dove la vita media dei soggetti è di 914 giorni (Yuan *et al*., 2011). In modo particolare sono stati osservati gli effetti di alcune sostanze farmacologicamente attive e alcuni fattori ambientali sui geni che regolano la durata media della vita. Il costo del mantenimento e l'impegno gestionale per il topo è comunque molto alto rispetto ad altri modelli vertebrati come i pesci, che quindi riscuotono sempre più successo.

Tra le specie ittiche più utilizzate troviamo lo zebrafish (*Danio rerio*). Questo piccolo ciprinide tropicale è stato infatti eletto dalla comunità scientifica come animale di laboratorio per una nutrita serie di indagini e prove sperimentali. La ragione del suo successo è legata al fatto che presenta uova embrionate trasparenti che le rendono molto facilmente osservabili e geneticamente manipolabili durante le sue prime fasi di sviluppo (cosa che invece non è possibile fare con il topo). La facilità con cui poi può essere stabulato e riprodotto in condizioni controllate e standardizzate lo hanno reso sicuramente un ottimo modello per tutti quegli studi che riguardano i meccanismi molecolari che presiedono lo sviluppo dei vertebrati (Veldman e Lin, 2008; Duboc *et al*., 2015; Kikuchi, 2015) o i processi rigenerativi (Goessling e North, 2014). Sulla base di questi presupposti si è provato a utilizzare *D. rerio* anche negli studi sull'invecchiamento (Kishi *et al*., 2003; Anchelin *et al*., 2011; Kishi, 2011; Gilbert *et al*., 2014; Van Houcke *et al*., 2015), in modo particolare nell'ambito delle disfunzioni mitocondriali età-dipendenti, deterioramento dei telomeri e ossidazione delle proteine.

E' proprio tra le specie ittiche che è stato tuttavia individuato un modello ottimale, migliore rispetto allo zebrafish, ovvero il killifish (*Nothobranchius furzeri*) meglio noto come "African turquoise killifish" (fig. 1). Questo pesce presenta una serie di vantaggi rispetto agli altri animali di laboratorio in precedenza descritti. Ha una lunghezza di vita maggiore (ma non troppo) rispetto agli invertebrati e al contempo presenta, similmente agli altri vertebrati, una stretta condivisione con l'uomo della complessità biologica dei processi di invecchiamento. Un ulteriore vantaggio sono le piccole dimensioni, la possibilità di seguire lo sviluppo embrionario e costi gestionali bassi.

Vediamo di capire meglio che cosa è un killifish (http://www.aik.it/) e perché proprio tra questi pesci è stato individuato il modello animale ottimale per gli studi sull'invecchiamento. L'insolito nome "Killi-fish" deriva dalla parola olandese "kilde" o "kills" che significa torrente, usata dai colonizzatori olandesi del XVII secolo insediatisi in una piccola parte della costa orientale del Nordamerica. In poco tempo vennero soprannominati kill o killifish anche i pesci che abitavano quelle acque. Sebbene successivamente gli inglesi ebbero il sopravvento sulle colonie olandesi, rimase l'usanza di riferirsi ai piccoli pesci come "kill-fish". Col tempo questo nome fu dato estensivamente a tutti i pesci che venivano mano a mano scoperti e classificati appartenenti a una famiglia ben precisa: quella dei Ciprinodontidi ovvero delle "Toothcarps Group, Egg-laying fishes" (letteralmente "carpe fornite di denti che depongono uova"). Un altro termine piuttosto popolare in passato per gli stessi pesci era "top minnows".

Attualmente appartengono a questo gruppo oltre 450 specie, diffuse in vari continenti (Africa, Europa, Medio Oriente e Asia). Tali specie si riscontrano sia in acque dolci sia in quelle salmastre. La maggior parte dei killifish ha piccole dimensioni: la taglia è compresa tra i 2,5 e i 5 cm e solo in alcuni casi raggiunge i 15 cm.

Molti killifish, nonostante la diversità di habitat, vivono in ruscelli, fiumi e laghi dove l'acqua è sempre presente. Questo è il caso dei generi *Cyprinodon*, *Fundulus* e *Rivulus* in Ame-

rica, così come in Africa e Asia per *Aphyosemion*, *Aplocheilus*, *Epiplatys*, *Fundulopanchax*, *Lacustricola,* ed Europa del sud con *Aphanius*. Per queste specie la durata della vita è di 2-3 anni. Diversa invece è la biologia dei generi africani *Nothobranchius*, dei sudamericani *Austrolebias*, *Gnatholebias*, *Pterolebias*, *Simpsonichth*ys e *Terranatos* che si sono specializzati per vivere negli ambienti aridi, in pozze d'acqua provvisorie che si formano in modo effimero durante la breve stagione delle piogge (da qui per l'appunto la denominazione di "pesci della pioggia"). Questi hanno conseguentemente una durata della vita molto più corta, (pochi mesi), e un ciclo biologico e riproduttivo rapido. Durante la loro breve esistenza si nutrono soprattutto di artropodi acquatici, vermi e crostacei, accrescendosi molto rapidamente e raggiungendo altrettanto rapidamente la maturità sessuale. Molto marcato è il dimorfismo sessuale, per cui i maschi manifestano colorazioni intense (le femmine molto meno) e attraenti anche per l'occhio di un acquariofilo (da qui la notevole diffusione nell'ambito di tale hobby). I maschi, per lo più aggressivi e battaglieri, si affrettano ad accoppiarsi con più femmine possibili. La deposizione delle uova avviene in un substrato in genere fangoso. Queste uova hanno la peculiarità di resistere molti mesi in condizioni di siccità, nell'attesa che una nuova pioggia inneschi lo sviluppo embrionale e quindi la schiusa. Questo strabiliante meccanismo consente la sopravvivenza della specie (Blazek *et al*., 2013; Furness *et al*., 2015). Questi ciprinodontidi sono chiamati "annuali" perché non vivono in natura più di nove mesi (alcuni molto meno). Tra di essi troviamo proprio *N. furzeri*.

In natura tale specie è diffusa nelle pozze d'acqua temporanee del Mozambico e Zimbawe. L'intero ciclo biologico del pesce, che va dalla schiusa delle uova embrionate resistenti alle condizioni di siccità, passando per un rapido accrescimento, accoppiamento e deposizione di nuove uova, dura dai 4 ai 9 mesi. L'accoppiamento e la deposizione delle uova (da 20 a 200 al giorno per ogni femmina) deve avvenire assolutamente prima del completo prosciugamento della pozza dove in natura i pesci vivono. Dalla forma originaria allevata in cattività sin dal 1968 (Valdesalici e Cellerino, 2003; Genade *et al*., 2005;) sono state ottenute molte linee di laboratorio con una vita media più corta rispetto a quella originaria, variabile da 9 a 16 settimane in funzione delle condizioni di allevamento (Genade *et al*., 2005; Terzibasi *et al*., 2008; Kirschner *et al*., 2012). Un'altra particolarità delle forme di allevamento è che non si evidenzia una differenza significativa fra il numero di maschi e femmine, diversamente da quello che accade in natura dove le femmine sono più abbondanti dei maschi (Valenzano *et al*., 2015). Lo sviluppo embrionale di questo killifish dura circa 2-3 settimane e può andare incontro a un periodo di arresto di sviluppo noto come diapausa (Wourms, 1972). In queste condizioni può vivere molti mesi in un substrato terroso appena umido. In laboratorio tuttavia la diapausa non si manifesta. I geni e i fattori che inducono la diapausa sono ancora poco noti ma sembrano correlati a quelli che regolano lo sviluppo e l'invecchiamento degli adulti.

N. furzeri, nonostante la breve ed intensa vita, condivide con gli altri esseri viventi, tra cui l'uomo, molti meccanismi molecolari implicati nell'invecchiamento (Genade *et al*., 2005; Terzibasi *et al*., 2007; Hartmann *et al*., 2009; Terzibasi *et al*., 2009; Hartmann *et al*., 2011). Balza subito all'occhio come i maschi di questo pesce perdano, invecchiando, i loro bei colori (così come nell'uomo, dove vi è un progressivo incanutimento). Altre similitudini riguardano la deviazione della colonna vertebrale, i deficit visivi, la riduzione dell'attività locomotoria, la riduzione della fertilità e l'aumento della probabilità di sviluppare tumori. Sembra che molte analogie tra i processi patologici età-dipendenti di *N. furzeri* e quelli umani, più che con altri vertebrati quali lo zebrafish e il topo, siano legati ad alterazioni dei telomeri. Questi ultimi infatti sono simili per lunghezza a quelli umani (Hartmann *et al*., 2009). Anche le alterazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) giocherebbero un ruolo fondamentale in tali processi (Vermulst *et al*., 2008).

Numerosi sono i biomarkers molecolari che di volta in volta vengono reputati più idonei

per studiare i processi di invecchiamento del turqoise killifish, a seconda delle strutture cellulari di interesse. Ad esempio l'accumulo di lipofuscine indica una senescenza del tessuto nervoso e del fegato (Goyal, 1982), alcuni enzimi come le β-galactosidasi indicano un aumento dello stato di stress cellulare (Dimri *et al*., 1995; Yegorov *et al*., 1998; Kurz *et al*., 2000; Untergasser *et al*., 2003; Cristofalo, 2005), così come l'instabilità del DNA mitocondriale (Tauchi e Sato, 1968; Yen *et al*., 1989; Barazzoni *et al*., 2000; Yui *et al*., 2003; Lopez-Otin *et al*., 2013). La presenza di alcune proteine dette "tumore-associate" compaiono nei processi neoplastici (Di Cicco *et al*., 2011). Molti studi inoltre vengono eseguiti per i tumori del fegato perché *N. furzeri* è una tra le specie che hanno evidenziato, più di altre, similitudini con i tumori epatici dell'uomo. Le notevoli capacità rigenerative di questo pesce sono invece state indagate osservando la capacità di rigenerazione del peduncolo caudale, che cala drasticamente con l'invecchiamento (Wendler *et al*., 2015). Questi sono solo alcuni esempi delle numerose e complesse attività di ricerca scientifica in cui è coinvolto l'African turquoise killifish.

Concludiamo dicendo che la disponibilità di molte linee genetiche mutanti, di diversi biomarkers molecolari e metodiche di indagine permette uno studio dettagliato e articolato dell'effetto dell'invecchiamento nei vari tessuti del pesce che, similmente all'uomo, risentono dell'effetto sia di fattori endogeni genetici sia di fattori esogeni (modulabili in laboratorio) quali quelli di natura infettiva, ambientale e nutrizionale. Un'ampia e dettagliata rassegna inerente gli studi su *N. furzeri* è riportata da Kim *et al*., (2016) a cui rimandiamo per l'approfondimento di tali argomenti.

Bibliografia

- Akushevich, I., Kravchenko, J., Ukraintseva, S., Arbeev, K. and Yashin, A. I. (2013). Time trends of incidence of age-associated diseases in the US elderly population: medicare-based analysis. Age Ageing 42, 494-500.
- Anchelin, M., Murcia, L., Alcaraz-Pe´rez, F., Garcı´a-Navarro, E. M. and Cayuela, M. L. (2011). Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish. PLoS ONE 6, e16955.
- Barazzoni, R., Short, K. R. and Nair, K. S. (2000). Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. J. Biol. Chem. 275, 3343-3347.
- Blazek, R., Polacik, M. and Reichard, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. Evodevo 4, 24.
- Brody, J. A. and Grant, M. D. (2001). Age-associated diseases and conditions: implications for decreasing late life morbidity. Aging 13, 64-67.
- Burtner, C. R. and Kennedy, B. K. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 567-578.
- Collins, J. J., Huang, C., Hughes, S. and Kornfeld, K. (2008). The measurement and analysis of age-related changes in Caenorhabditis elegans. WormBook
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K. N., Xu, K. X., Strathearn, K. E., Liu, F. et al. (2006). alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. Science 313, 324-328.
- Craig, T., Smelick, C., Tacutu, R., Wuttke, D., Wood, S. H., Stanley, H., Janssens, G., Savitskaya, E., Moskalev, A., Arking, R. et al. (2015). The Digital Ageing Atlas: integrating the diversity of age-related changes into a unified resource. Nucleic Acids Res. 43, D873-D878.
- Cristofalo, V. J. (2005). SA beta Gal staining: biomarker or delusion. Exp. Gerontol. 40, 836-838.
- de Magalhaes, J. P. (2004). From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing. Exp. Cell Res. 300, 1-10.
- Demontis, F. and Perrimon, N. (2010). FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. Cell 143, 813-825.
- Di Cicco, E., Tozzini, E. T., Rossi, G. and Cellerino, A. (2011). The short-lived annual fish Nothobranchius furzeri shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. Exp. Gerontol. 46, 249-256.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9363-9367.
- Duboc, V., Dufourcq, P., Blader, P. and Roussigne, M. (2015). Asymmetry of the brain: development and implications. Annu. Rev. Genet. 49, 647-672.
- Eisenstein, M. (2012). Centenarians: great expectations. Nature 492, S6-S8.
- Ethan, B. and McGinnis, W. (2004). Model organisms in the study of development and disease. Oxford Monogr. Med. Genet. 49, 25-45.
- Furness, A. I., Lee, K. and Reznick, D. N. (2015). Adaptation in a variable environment: phenotypic plasticity and bet-hedging during egg diapause and hatching in an annual killifish. Evolution 69, 1461-1475.
- Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Valenzano, D. R., Cattaneo, A. and Cellerino, A. (2005). Annual fishes of the genus Nothobranchius as a model system for aging research. Aging Cell 4, 223-233.
- Gibert, Y., Trengove, M. C. andWard, A. C. (2013). Zebrafish as a genetic model in pre-clinical drug testing and screening. Curr. Med. Chem. 20, 2458-2466.

– Gilbert, M. J. H., Zerulla, T. C. and Tierney, K. B. (2014). Zebrafish (Danio rerio) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. Exp. Gerontol. 50, 106-113.
– Goessling, W. and North, T. E. (2014). Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. Dis. Model. Mech. 7, 769-776.
– Goyal, V. K. (1982). Lipofuscin pigment accumulation in human brain during aging. Exp. Gerontol. 17, 481-487.
– Guo, L., Karpac, J., Tran, S. L. and Jasper, H. (2014). PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. Cell 156, 109-122.
– Haddadi, M., Jahromi, S. R., Sagar, B. K. C., Patil, R. K., Shivanandappa, T. and Ramesh, S. R. (2014). Brain aging, memory impairment and oxidative stress: a study in Drosophila melanogaster. Behav. Brain Res. 259, 60-69.
– Hartmann, N., Reichwald, K., Lechel, A., Graf, M., Kirschner, J., Dorn, A., Terzibasi, E., Wellner, J., Platzer, M., Rudolph, K. L. et al. (2009). Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Mech. Ageing Dev. 130, 290-296.
– Hartmann, N., Reichwald, K., Wittig, I., Drose, S., Schmeisser, S., Luck, C., Hahn, C., Graf, M., Gausmann, U., Terzibasi, E. et al. (2011). Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Aging Cell 10, 824-831.
– Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Frohlich, K.-U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S. and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. J. Cell Biol. 164, 501-507.
– Kaeberlein, M., Powers, R. W., III, Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E. O., Kirkland, K. T., Fields, S. and Kennedy, B. K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. Science 310, 1193-1196.
– Kim Y, Nam H.G., Valenzano D.R. (2016) The short-lived African turquoise killifish: an emerging experimental model for ageing. Dis Model Mech. Feb;9(2):115-29.
– Kikuchi, K. (2015). Dedifferentiation, transdifferentiation, and proliferation: mechanisms underlying cardiac muscle regeneration in zebrafish. Curr. Pathobiol. Rep. 3, 81-88.
– Kirkwood, T. B. L. and Austad, S. N. (2000). Why dowe age? Nature 408, 233-238.
– Kirschner, J., Weber, D., Neuschl, C., Franke, A., Bottger, M., Zielke, L., Powalsky, E., Groth, M., Shagin, D., Petzold, A. et al. (2012). Mapping of quantitative trait loci controlling lifespan in the short-lived fish Nothobranchius furzeri–a new vertebrate model for age research. Aging Cell 11, 252-261.
– Kishi, S. (2011). The search for evolutionary developmental origins of aging in zebrafish: a novel intersection of developmental and senescence biology in the zebrafish model system. Birth Defects Res. C Embryo Today 93, 229-248.
– Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A. M., Goto, T., Lin, M. C. and Tsai, S. B. (2003). The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. Exp. Gerontol. 38, 777-786.
– Klass, M. R. (1983). A method for the isolation of longevity mutants in the nematode Caenorhabditis elegans and initial results. Mech. Ageing Dev. 22, 279-286.
– Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J. D. (2000). Senescenceassociated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J. Cell Sci. 113, 3613-3622.
– Longo, V. D., Ellerby, L. M., Bredesen, D. E., Valentine, J. S. and Gralla, E. B. (1997). Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. J. Cell Biol. 137, 1581-1588.
– Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. Cell 153, 1194-1217.

– Masoro, E. J. and Austad, S. N. (2006). Handbook of the Biology of Aging. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press.
– Ocorr, K., Perrin, L., Lim, H.-Y., Qian, L., Wu, X. and Bodmer, R. (2007). Genetic control of heart function and aging in Drosophila. Trends Cardiovasc. Med. 17, 177-182.
– Sinclair, D. A. and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles–a cause of aging in yeast. Cell 91, 1033-1042.
– Tauchi, H. and Sato, T. (1968). Age changes in size and number of mitochondria of human hepatic cells. J. Gerontol. 23, 454-461.
– Terzibasi, E., Valenzano, D. R. and Cellerino, A. (2007). The short-lived fish Nothobranchius furzeri as a new model system for aging studies. Exp. Gerontol. 42, 81-89.
– Terzibasi, E., Valenzano, D. R., Benedetti, M., Roncaglia, P., Cattaneo, A., Domenici, L. and Cellerino, A. (2008). Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish Nothobranchius furzeri. PLoS ONE 3, e3866.
– Terzibasi, E., Lefrancois, C., Domenici, P., Hartmann, N., Graf, M. and Cellerino, A. (2009). Effects of dietary restriction on mortality and age-related phenotypes in the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Aging Cell 8, 88-99.
– Untergasser, G., Gander, R., Rumpold, H., Heinrich, E., Plas, E. and Berger, P. (2003). TGF-beta cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence. Exp. Gerontol. 38, 1179-1188.
– Valdesalici, S. and Cellerino, A. (2003). Extremely short lifespan in the annual fish Nothobranchius furzeri. Proc. Biol. Sci. 270 Suppl. 2, S189-S191.
– Valenzano, D. R., Benayoun, B. A., Singh, P. P., Zhang, E., Etter, P. D., Hu, C.-K., Clément-Ziza, M., Willemsen, D., Cui, R., Harel, I. et al. (2015). The African turquoise killifish genome provides insights into evolution and genetic architecture of lifespan. Cell 163, 1539-1554.
– Van Houcke, J., De Groef, L., Dekeyster, E. and Moons, L. (2015). The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair. Ageing Res. Rev. 24, 358-368.
– Veldman, M. B. and Lin, S. (2008). Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. Pediatr. Res. 64, 470-476.
– Verduyckt, M., Vignaud, H., Bynens, T., Van den Brande, J., Franssens, V., Cullin, C. and Winderickx, J. (2016). Yeast as a model for Alzheimer's disease: latest studies and advanced strategies. Methods Mol. Biol. 1303, 197-215.
– Vermulst, M.,Wanagat, J., Kujoth, G. C., Bielas, J. H., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A. and Loeb, L. A. (2008). DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. Nat. Genet. 40, 392-394.
– Wendler, S., Hartmann, N., Hoppe, B. and Englert, C. (2015). Age-dependent decline in fin regenerative capacity in the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Aging Cell 14, 857-866.
– Wourms, J. P. (1972). The developmental biology of annual fishes. III. Preembryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. J. Exp. Zool. 182, 389-414.
– Yang, Y. and Wilson, D. L. (2000). Isolating aging mutants: a novel method yields three strains of the nematode Caenorhabditis elegans with extended life spans. Mech. Ageing Dev. 113, 101-116.
– Yegorov, Y. E., Akimov, S. S., Hass, R., Zelenin, A. V. and Prudovsky, I. A. (1998). Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. Exp. Cell Res. 243, 207-211.
– Yuan, R., Peters, L. L. and Paigen, B. (2011). Mice as a mammalian model for research on the genetics of aging. ILAR J. 52, 4-15.
– Yui, R., Ohno, Y. and Matsuura, E. T. (2003). Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging Drosophila melanogaster. Genes Genet. Syst. 78, 245-251.

DA UN PICCOLO PESCE AFRICANO, UN GRANDE MODELLO PER LO STUDIO DELL'INVECCHIAMENTO E DELLE PATOLOGIE DEGENERATIVE

GIACOMO ROSSI

Scuola di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Camerino

Introduzione

Ho aderito con molto entusiasmo al progetto editoriale dei Proff. Guarda e Bollo sui modelli animali in patologia comparata, perché ritengo che rappresentino un approccio fondamentale per la comprensione dei meccanismi patogenetici che governano un processo patologico complesso, permettendo quindi di arrivare dallo studio di base a quello più finalizzato e applicativo di approccio terapeutico alla malattia.

Molti processi patologici, se non tutti, sono comuni nei loro tratti principali nell'uomo come negli animali. Quando si ha la fortuna di avere un modello di patologia spontanea in un altro organismo complesso non umano, si ha la possibilità di studiare la malattia nella maniera più "naturale" possibile e ciò non è neppure lontanamente paragonabile allo studiare una patologia o una sindrome in un modello animale sperimentalmente indotto (per transgenesi, per impianto o per transfezione).

Tra i modelli animali che ritengo più "plastici" e interessanti per potenzialità applicative, vi è un genere di piccoli pesci africani, di cui mi occupo da svariati anni, che ha una biologia estremamente affascinante e che passerò a descrivere in questo capitolo.

Il genere *Nothobranchius* e i modelli animali sull'invecchiamento

I pesci annuali africani del genere *Nothobranchius*, conosciuti anche come "killifish", sono piccoli teleostei che abitano bacini idrici temporanei soggetti a disidratazione annua a causa dell'alternarsi delle stagioni monsoniche. La necessità di avere un ciclo biologico rapidissimo, ovvero compreso tra una stagione umida e l'altra, ha generato in questi pesci una biologia unica, che li ha imposti come un modello in diverse discipline biologiche. La loro crescente popolarità deriva quindi dalla loro durata di vita che è estremamente breve: questi pesci nascono, arrivano a maturità sessuale, si riproducono e invecchiano in tempi veramente brevissimi (da 3 mesi a poco più di 18 mesi, a seconda della specie, della sottospecie o del ceppo) (Valdesalici e Cellerino, 2003; Di Cicco *et al*., 2011; Lucas-Sanchez *et al*., 2014; Baumgart *et al*., 2015) e questa peculiarità rappresenta il risultato del loro specifico adattamento all'ambiente in cui si sono evoluti. In particolare, vi è una stretta correlazione tra la durata della vita in cattività di una specie o ceppo e l'aridità del suo habitat naturale; tanto più questo è arido (e quindi tanto più in fretta si prosciugano le pozze ove il ceppo vive), tanto più veloce sarà il ciclo biologico dei pesci. Questa peculiarità si mantiene inalterata anche quando i pesci sono mantenuti in condizioni di laboratorio.

Tra le specie più popolari vi è sicuramente *Nothobranchius furzeri* (fig. 1) , dato che rappresenta la specie che, tra i vertebrati, ha la più breve durata di vita mai registrata in cattività. La breve aspettativa di vita è associata ad un rapido declino funzionale età-dipendente e questo declino rappresenta l'espressione di cambiamenti cellulari e molecolari simili a quelli osservati in altri vertebrati, uomo compreso, durante l'invecchiamento, ma accelerati all'en-

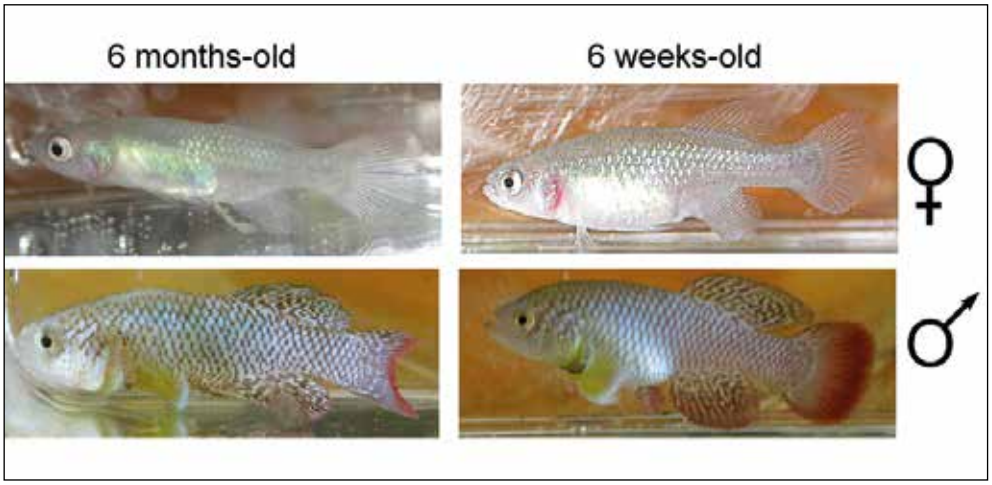


Fig. 1. Modificazioni morfologiche in *Nothobranchius furzerii* in corso di senescenza. Si noti come nel giovane maschio a destra, il colore della livrea sia molto acceso, il corpo risulti affusolato e ben proporzionato e le pinne perfettamente definite e identiche per forma e volume. Nel soggetto di sinistra, stesso maschio fotografato dopo 6 mesi, sono evidenti i segni di avanzata senescenza: si osserva un incurvamento del rachide con forte deterioramento delle pinne, che appaiono sfrangiate, asimmetriche e decolorate. La livrea ha perso in brillantezza e colore e anche i riflessi e i movimenti del pesce sono molto rallentati, con forti deficit cognitivi. Nella femmina le modificazioni morfologiche esteriori sono meno evidenti.

nesima potenza. Studiando le cellule e i tessuti di esemplari del genere *Nothobranchius*, è in pratica come se ogni giorno si osservassero i processi alterativi e degenerativi che generalmente si producono in un anno di vita dell'uomo. A questa peculiarità del modello va aggiunto che il recente sviluppo della transgenesi applicato a questa specie rende possibile l'inserimento di costrutti genomici specifici e la creazione di linee transgeniche facilitate dal brevissimo tempo di generazione (che può essere spesso più breve anche di 1 mese). Queste caratteristiche rendono le specie del genere *Nothobranchius* particolarmente adatte allo studio degli aspetti biologici e molecolari dell'invecchiamento e delle disfunzioni organiche o cellulari senescenza-associate.

Allo stesso tempo questi pesci rappresentano anche un modello unico per lo studio dell'adattamento evolutivo in risposta alla pressione dei fattori ambientali esercitata sul genoma.

I killifish appartengono alla classe Cyprinodonti (ordine Cyprinodontiformi), occupanti habitat marginali spesso inospitali per gli altri pesci teleostei (Naiman *et al*., 1973;. Taylor *et al*., 2008). La maggior parte dei killifish annuali africani appartiene al genere *Nothobranchius* (*Nothobranchiidae*), che comprende oltre 60 specie distribuite in Africa orientale e centrale (Froese e Pauly, 2014). Si tratta di piccoli pesci (3-15 cm di lunghezza totale, tipicamente inferiore a 7 cm), con marcato dimorfismo sessuale e dicromatismo. Il loro corto ciclo vitale (come abbiamo detto, in natura non arriva ai 12 mesi, e più spesso non supera i tre mesi) è interamente adattato alle condizioni effimere e imprevedibili del loro habitat. Il pesce nasce quando il bacino è pieno d'acqua, cresce rapidamente e diventa sessualmente maturo entro poche settimane (Poláčik *et al*., 2011; Blazek *et al*., 2013). Dopo aver raggiunto la maturi-

tà sessuale, i pesci si riproducono giornalmente per un breve periodo, con le uova che sono deposte nel substrato fangoso della pozza dove rimarranno anche dopo l'inaridimento dello stagno, letteralmente "cementate" nel fango essiccato che pure mantiene nel suo interno un po' di umidità tanto da non farle disidratare. Gli embrioni sopravvivono in diapausa per tutto il periodo secco e la loro schiusa è innescata da fattori estrinseci indotti da una nuova inondazione dell'habitat. Lo stesso ciclo ecologico dei killifish si verifica anche nei Neotropici; nella regione secca in cui ritroviamo la Grand Savanna (Colombia, Venezuela) e il Cerrado (Brasile) a nord dell'equatore (Nico e Thomerson, 1989), oppure l'ecosistema temperato della Pampa, a sud dell'equatore (Berois *et al*., 2014).

Prima della scoperta del genere *Nothobranchius*, la ricerca sull'invecchiamento nei vertebrati era fortemente ostacolata dalla mancanza di modelli animali a ciclo biologico di breve durata. Due fattori quindi hanno fortemente incentivato lo studio dell'invecchiamento e più in generale dei processi degenerativi: la scoperta di modelli animali adeguati, tra cui primeggia *Nothobranchius*, e la scoperta, in era post-genomica, dell'associazione tra un gene e una malattia.

Non è sempre possibile comprendere fin dall'inizio come mutazioni del gene possano causare le manifestazioni cliniche della malattia. Talvolta, la funzione di nuovi geni associati a una data malattia è addirittura ignota. In questi casi, la biologia cellulare dispone di metodi sperimentali per definire la funzione dei nuovi geni e delle nuove proteine. Uno dei primi approcci consiste nello studio della distribuzione della proteina nei tessuti e all'interno delle cellule. In un secondo momento, si passa ad analizzare la conseguenza dell'espressione della proteina (in cellule in coltura) e dell'inattivazione del gene (nell'animale da laboratorio). Per quanto validi come punto di partenza, questi approcci sperimentali presentano alcune limitazioni. In particolare, essi non permettono di definire la funzione di una proteina nel contesto delle sue interazioni con altre proteine e nell'ambito delle diverse vie di segnalazione. È proprio l'utilizzo di semplici organismi modello che, avvalendosi delle versatili tecniche della genetica, può complementare l'analisi iniziata dalla biologia cellulare.

Prima della scoperta della versatilità di *Nothobranchius* quale modello, gli organismi che venivano comunemente utilizzati nella ricerca biomedica sull'invecchiamento erano il topo, (che presenta però un periodo di generazione troppo lungo per poter effettuare studi che richiedono un numero elevato di ripetizioni e costi contenuti), ma anche eucarioti molto diversi fra loro, sia unicellulari (il lievito *Saccharomyces cerevisiae*) sia multicellulari. Tra questi ultimi, vi sono sia invertebrati (il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* e il verme nematode *Caenorhabditis elegans*) sia vertebrati (il pesce *Danio rerio,* il Medaka giapponese e, appunto, il topo *Mus musculus*).

In anni recenti, tre premi Nobel per la fisiologia e la medicina sono stati conferiti per ricerche su *Drosophila* (nel 1995), *S. cerevisiae* (nel 2001), e *C. elegans* (nel 2002), a conferma dell'importanza di questi studi per la medicina moderna.

Il nematode *C. elegans* è stato il primo organismo pluricellulare il cui genoma è stato sequenziato completamente nel 1993, seguito, due anni più tardi, da *Drosophila*. L'analisi del genoma di questi due organismi ha un grande significato culturale, perché ha messo in luce alcuni dati del tutto inattesi. In primo luogo, l'apparente semplicità di questi organismi potrebbe far supporre che il numero di proteine che li costituiscono sia limitato. Tuttavia, il numero di geni presenti nel loro genoma è assai elevato. Ad esempio, ci sono ben 6241 geni in *S. cerevisiae*, 13.601 in *Drosophila*, e 18.424 in *C. elegans*. Questi numeri rappresentano il cosiddetto *nucleo proteomico*, cioè tutte le proteine che si possono predire sulla base delle sequenze codificanti di DNA (senza contare tutte le altre proteine che si possono formare per modificazioni post-translazionali e per *alternative splicing* del nucleo proteomico). In secondo luogo, l'enorme distanza evoluzionistica fra questi invertebrati e l'uomo (misurabile

in centinaia di milioni di anni) e le evidenti diversità anatomiche sembrerebbero precludere l'utilizzo di questi invertebrati per lo studio delle patologie umane, anche se l'analisi del genoma di *C. elegans* e di *Drosophila* ha messo in luce che un'alta percentuale (più del 65%) di geni associati a patologie umane (come risulta dalla banca dati OMIM) ha un ortologo, cioè un gene omologo in *C. elegans* o in *Drosophila*.

Il contributo del killifish allo studio della regolazione del ciclo cellulare e delle patologie degenerative

Quando si desidera utilizzare un organismo modello, si pone il problema della scelta dell'organismo stesso. Il criterio principale per affrontare questa scelta (oltre all'esperienza di ogni laboratorio di genetica per lo studio di un particolare organismo) dipende dal problema biologico in esame.

Se si vuole definire la funzione di un nuovo gene, il criterio principale è la presenza di un ortologo per il gene in esame nel genoma di un dato organismo. Se si vuole invece caratterizzare quali geni sono coinvolti in una data funzione, il criterio principale è l'utilità di un particolare organismo per lo studio della funzione in esame.

Come esempi storici, si può ricordare che *S. cerevisiae* si è dimostrato particolarmente adatto per lo studio del ciclo cellulare e dei meccanismi di riparazione del DNA. L'embrione di *Drosophila* ha dato contributi fondamentali per la comprensione dei meccanismi di segmentazione del piano corporeo. *C. elegans* ha consentito la definizione dei meccanismi di apoptosi, o morte cellulare programmata, nel corso dello sviluppo. Infine, *D. rerio* è stato molto utile per lo studio dell'organogenesi, e in particolare del sistema cardio-circolatorio. Ma nessuno di questi modelli eguaglia *Nothobranchius* (*N. furzeri* e *N. guentheri*) per versatilità, per presenza di geni ortologi e per la velocità di generazione. Gli esemplari di *Nothobranchius* infatti possono: *(a)* essere allevati e mutati a seconda dello studio che si intende condurre, bloccando in diapausa le uova (in un contenitore con della semplice torba leggermente umida) del ceppo in studio, che così può essere conservato per mesi o anni, offrendo metodi economici di conservazione degli embrioni svincolati dalla catena del freddo; *(b)* gli esemplari di *Nothobranchius* mostrano una crescita accelerata e esprimono biomarker tipici dell'invecchiamento, sviluppano lesioni istologiche caratteristiche della degenerazione senile sovrapponibili a quelle umane, nonché sviluppano un comportamento caratteristico degli anziani contraddistinto da depressione, insicurezza nell'esplorare nuovi ambienti, momenti di amnesia e progressiva riduzione della mobilità; *(c)* alcuni ceppi della specie *N. furzeri* hanno una massima aspettativa di vita di soli 90 giorni, offrendo la possibilità di effettuare indagini finora impensabili in un vertebrato, come screening di farmaci che permettano trattamenti farmacologici per tutta la vita studiandone gli effetti collaterali a lungo e lunghissimo termine ma in tempi estremamente limitati (terapie croniche); *(d)* la totale sequenziazione del genoma di *Nothobranchius* ha permesso di individuare geni tipici dell'invecchiamento come ad esempio p66Shc e MTP che hanno un identico corrispettivo nell'uomo. Infine, a seguito del sequenziamento del genoma, oggi in questi pesci possono essere agevolmente condotte tecniche di transgenesi e di *genome-editing*. *(e)* In linea con la recente Direttiva europea sull'uso di animali a fini scientifici, è stimato che l'uso di *Nothobranchius* permetterà di ridurre progressivamente ma in maniera drastica il numero di vertebrati superiori che si utilizzano nella ricerca biomedica (Terzibasi *et al*.., 2007).

In linea generale, a seguito del sequenziamento del genoma, oggi in *Nothobranchius* si possono condurre due tipi di analisi genetica, che sono definiti *reverse* e *forward genetics*. Come descritto prima a proposito della scelta del tipo di organismo, anche la scelta del tipo di analisi dipende dalla domanda biologica iniziale.

L'approccio della *reverse genetics* si utilizza quando si vuole conoscere la funzione di un gene. L'approccio consiste nell'eliminare il gene in esame e quindi nell'osservare le conseguenze funzionali dell'assenza del gene sul fenotipo dell'animale. È possibile eliminare sia il gene stesso a livello di DNA (facendone un "*knock out*" mediante ricombinazione omologa) sia il suo RNA messaggero (mediante *short interference RNA*). L'approccio della *forward genetics* si utilizza invece quando si vuole identificare quali geni sono coinvolti in una data funzione. L'approccio consiste nell'introdurre mutazioni a caso nel genoma dell'animale (spesso utilizzando mutageni chimici). In seguito, si selezionano i rari mutanti (fra la progenie dell'animale mutagenizzato) che presentano difetti nella funzione in esame. Infine, si identificano quali geni sono stati mutati (mediante *positional cloning*). In altri termini, la *reverse genetics* consente di attribuire una nuova funzione ad un gene conosciuto, mentre la *forward genetics* permette di identificare nuovi geni che mediano una funzione conosciuta.

Differenze nell'invecchiamento di *Nothobranchius furzeri*, a seconda del ceppo

Gli Studi sull'invecchiamento e il relativo declino cognitivo di *N. furzeri* hanno avuto inizio proprio con la valutazione dei differenti tempi di aspettativa di vita in cattività dei vari ceppi campionati in natura.

Vari studi hanno mostrato come la prole F1 e F2 di *N. furzeri* sviluppi più meno precocemente una forte espressione di lipofuscina con chiari segni neurodegenerativi a seconda della lunghezza della vita che dipende strettamente dall'areale di provenienza. Pesci che vengono da habitat più aridi hanno una finestra di sopravvivenza più breve in natura, mentre le linee nate in cattività derivanti da habitat semi-aridi e sub-umidi differiscono nella longevità e nell'espressione della lipofuscinosi neuronale e nella neurodegenerazione.

I pesci che hanno una vita più breve hanno una accelerata espressione di marcatori legati all'invecchiamento e, a causa delle grandi differenze nei fenotipi di invecchiamento, *N. furzeri* potrebbe rappresentare un sistema modello per studiare il controllo genetico in alcuni tratti di vita o storia delle popolazioni naturali.

Un modello di invecchiamento così "plastico" come *Nothobranchius* si presta perfettamente alla valutazione dell'influenza che molti fattori ambientali ed alimentari possono avere sui processi degenerativi e sulle malattie metaboliche, rappresentando i fattori più importanti di rischio nella fase senescente.

a) Influenza della dieta sulla longevità

In una prima serie di esperimenti è stato sottoposto a test l'effetto di una forte restrizione dietetica sulla sopravvivenza di *Nothobranchius*. In particolare è stata testata l'espressione di una serie di marcatori legati all'età e il loro andamento in caso di restrizione dietetica. Si sono messi a confronto due ceppi di pesci, uno selvatico (più longevo) e uno allevato in laboratorio da alcune generazioni in consanguineità. I risultati di questa prima serie di studi hanno dimostrato che nella linea di laboratorio la restrizione dietetica ha fortemente ridotto l'incidenza di patologie degenerative, prolungando di molto la durata massima della vita. Nella linea selvatica, la restrizione dietetica ha indotto invece effetti opposti, determinando una mortalità precoce, in fase giovanile, nei soggetti trattati, non riducendo il rischio generale relativo all'età e causando solo un prolungamento significativo della sopravvivenza negli individui che erano riusciti, in età giovanile, a superare la fase "critica" della restrizione.

In entrambe le linee, di allevamento e selvatica, la restrizione dietetica ha comunque impedito l'espressione dei "marker di vecchiaia" quali lo sviluppo di lipofuscine nel fegato e nel cervello. La restrizione dietetica ha anche migliorato le prestazioni in un particolare test di apprendimento e ha indotto una paradossale sovra-espressione di proteina acida fibrillare

gliale (GFAP) nel cervello dei pesci. La restrizione dietetica e quindi la conseguente riduzione calorica in questi pesci determina un notevole prolungamento della sopravvivenza e riduce sensibilmente gli effetti dell'età su organi quali il fegato e il cervello che più di altri vanno incontro ad una progressiva degenerazione durante l'invecchiamento.

Questi risultati sono poi stati validati anche su altri modelli animali e oggi si ritiene che possano essere traslati anche all'uomo.

La restrizione calorica sarebbe in grado di attivare meccanismi biologici differenti tra cui l'attivazione dei geni SIRT1, SIRT3 e SIRT4, che codificano per altrettanti enzimi ad azione deacetilante che hanno, tra gli altri, un effetto stabilizzante sul DNA, preservando più a lungo tutte le funzioni biologiche cellulari. In breve, quando la cellula si trova in condizioni di stress dovuto alla deprivazione di sostanze nutritive, i geni SIRT si attivano proteggendo le cellule dai danni dell'invecchiamento. La restrizione calorica quindi provoca, tra gli altri effetti, la trasmissione di un segnale attraverso la membrana cellulare che attiva un gene chiamato NAMPT e, di conseguenza, l'accumulo di nicotinammide-adenin-dinucleotide (NAD) nei mitocondri. Tale accumulo, a sua volta, determina un aumento dell'attività degli enzimi prodotti dal SIRT3 e dal SIRT4. In definitiva, ne risulta un aumento della produzione energetica dei mitocondri e un rallentamento dei processi di invecchiamento della cellula. Infine la riduzione calorica protratta sembra generare una maggior produzione di cellule progenitrici e staminali del sangue, con un complessivo ringiovanimento del sistema cellulare di ossa, muscoli, sistema immunitario e, non ultimo, cerebrale (incremento della neuronogenesi a livello ippocampale, determinante migliori prestazioni cognitive). Ciò avverrebbe nonostante si abbia una riduzione sostanziale dei livelli del fattore della crescita insulino-simile (IGF-1), mediatore dell'ormone della crescita, già osservata anche sugli esseri umani. Bassi livelli di IGF-1, coinvolto nei processi di sintesi delle biomolecole e regolatore chiave della proliferazione cellulare, riducono il rischio neoplastico e ormai da più parti giungono conferme del suo ruolo, insieme ai geni SIRT, di marcatore della longevità.

Dagli studi sull'influenza della restrizione calorica e più in generale della dieta sull'andamento dei marcatori dell'invecchiamento in *Nothobranchius*, sono scaturite importanti osservazioni inerenti possibili meccanismi preventivi nei confronti di malattie neurodegenerative dell'uomo, quali il morbo di Parkinson. La neurodegenerazione ha infatti diverse cause molecolari. Le alfa-sinucleinopatie sono correlate ad almeno tre malattie neurodegenerative: il morbo di Parkinson, la demenza a Corpi di Lewy e l' Atrofia multisistemica. Anche in alcuni ceppi di *N. furzeri*, quali il Gona-Re-Zhou (GRZ; dal nome dell'area africana ove il ceppo è stato isolato) che ha una aspettativa di vita di 9-12 settimane, è stato appurato un incremento età-dipendente di alfa-sinucleina e dei suoi oligomeri. Con l'età il pesce sviluppa deficit motori che possono essere spiegati dalla degenerazione del sistema dopaminergico. Dagli studi di Genade (2015) emerge chiaramente che lo sviluppo di una alfa-sinucleinopatia, generante una malattia simil-Parkinsoniana, determina una morte precoce in questo ceppo di pesci; interventi quali la restrizione calorica o la somministrazione di potenti molecole antiossidanti quali il resveratrolo e l'NT-020 (una particolare formula brevettata dalla University South of Florida, *Natura Therapeutics*, Inc., contenente aminoacidi, carnosina, carnitina e altri ingredienti non conosciuti che hanno un'azione sinergica come forti antiossidanti e stabilizzanti del pH) riescono a bloccare il processo neurodegenerativo prolungando quasi del doppio la sopravvivenza dei pesci trattati rispetto ai pesci di controllo. L'esame istologico dei cervelli dei pesci trattati ha costantemente rilevato una conservazione dei neuroni dopaminergici e una netta riduzione, rispetto al gruppo controllo, di accumuli di alfa-sinucleina, accumuli neurofibrillari, gliosi e placche di β-amiloide. Gli studi sull'effetto del resveratrolo, polifenolo antiossidante di derivazione dalla buccia dell'uva, nella prevenzione dei processi neurodegenerativi e di invecchiamento ha avuto importanti risvolti (Valenzano *et al*., 2006). In un gruppo

di 157 esemplari *N. furzeri*, la somministrazione giornaliera con il cibo di differenti concentrazioni di resveratrolo, a partire dal momento della maturità sessuale dei pesci (a 4 settimane di età, con dosaggio di 24, 120, e 600 microgrammi di resveratrolo per grammo di cibo, pari ad una dose di 12, 60 e 300 mg per un uomo di 70 kg di peso medio) ha portato i pesci trattati a un incremento massimo del 56/59% della durata di vita, rispetto ai controlli (tutti morti a 12 settimane). In uno studio analogo, ma effettuato su *Nothobranchius guentherii* (Liu *et al*., 2015), ricercatori cinesi hanno evidenziato come alla somministrazione di resveratrolo corrispondesse una netta riduzione di tutti i marcatori di stress ossidativo, così come i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il rilevo a 6, 9, e 12 mesi dell' attività degli enzimi antiossidanti e del grado di danno ossidativo, ha dimostrato un'attenuazione significativa dei tassi di incremento, età-dipendenti, dei livelli di ROS e di danno ossidativo, dimostrando che il resveratrolo diminuisce effettivamente lo stress ossidativo e incrementa la durata della vita.

Prima di questi studi su *Nothobranchius* si avevano solo prove di laboratorio che evidenziavano come il resveratrolo inibisse la perossidazione lipidica, il processo mediante il quale la frazione LDL del colesterolo è indotta a generare aterogenesi. Il resveratrolo inoltre inibisce l'aggregazione piastrinica e promuove la vasodilatazione ossido nitrico-mediata, mantenendo, tra le altre cose, una corretta omeostasi pressoria.

Un altro importante contributo dato da questo modello animale alle teorie sull'invecchiamento riguarda lo studio delle telomerasi. La misurazione della lunghezza dei telomeri (TL) è uno strumento genetico sempre più utilizzato negli studi evolutivi ed ecologici come marker di età e di fitness (Horn *et al*., 2009). Il sequenziamento dei due principali geni telomerasi TERT e TERC ha rivelato che entrambi i geni sono altamente conservati tra i ceppi di *N. furzeri,* fattore molto importante poiché sino a oggi non si erano trovati modelli animali analoghi in cui tali geni fossero così ben conservati. Entrambi i geni sono espressi ubiquitariamente in *N. furzeri* e i livelli di espressione di TERT e TERC, correlati con l'attività della telomerasi, sono tessuto-specifici. Studi sulla lunghezza dei telomeri effettuati sul ceppo GRZ (3,5 mesi di aspettativa di vita) di *N. furzeri* e sul ceppo MZM-0403 (6 mesi di vita) a partire da cellule del tessuto muscolare e della cute hanno evidenziato un sensibile accorciamento dei telomeri età-dipendente nel ceppo MZM-0403 (con l'aspettativa di vita più lunga), ma nessun significativo cambiamento nel ceppo GRZ a breve durata di vita. Inaspettatamente, nel tessuto muscolare e cutaneo dei pesci MZM-0403 più vecchi, il livello di espressione di TERT è aumentato, suggerendo che i telomeri si accorciano con l'invecchiamento nonostante l'aumento dell' espressione di TERT; questi studi quindi suggeriscono che l'accorciamento cromosomico sia correlato anche ad altri fattori che esulano dal solo meccanismo di declino o blocco dell'attività telomerasica (Hartmann *et al*., 2009).

b) Influenza della dieta sulla funzionalità del sistema immunitario, riproduttivo e sulla cancerogenesi

Il modello animale *Nothobranchius* offre quindi i vantaggi di avere una vita molto breve, paragonabile a quella di *Drosophila* e *Caenorhabditis*, pur essendo un vertebrato, quindi un organismo molto più complesso, paragonabile all'uomo, che presenta quindi organi e parenchimi ben differenziati, e un sistema immunitario perfettamente evoluto.

Proprio lo studio del sistema immunitario di questo modello, ha permesso di effettuare prime valutazioni su come l'invecchiamento sia correlato al declino dell' immunocompetenza e come questo meccanismo possa generare più facilmente lo sviluppo di infezioni intercorrenti anche mortali, o anche lo sviluppo molto più accelerato di neoplasie.

In uno studio effettuato su *N. furzeri* si è valutata ad esempio l'attività del sistema immunitario di soggetti trattati con resveratrolo o con restrizione calorica, risetto ai controlli (ceppi GRZ e MZM-0403). La valutazione è stata effettuata isolando le cellule della serie bianca dal

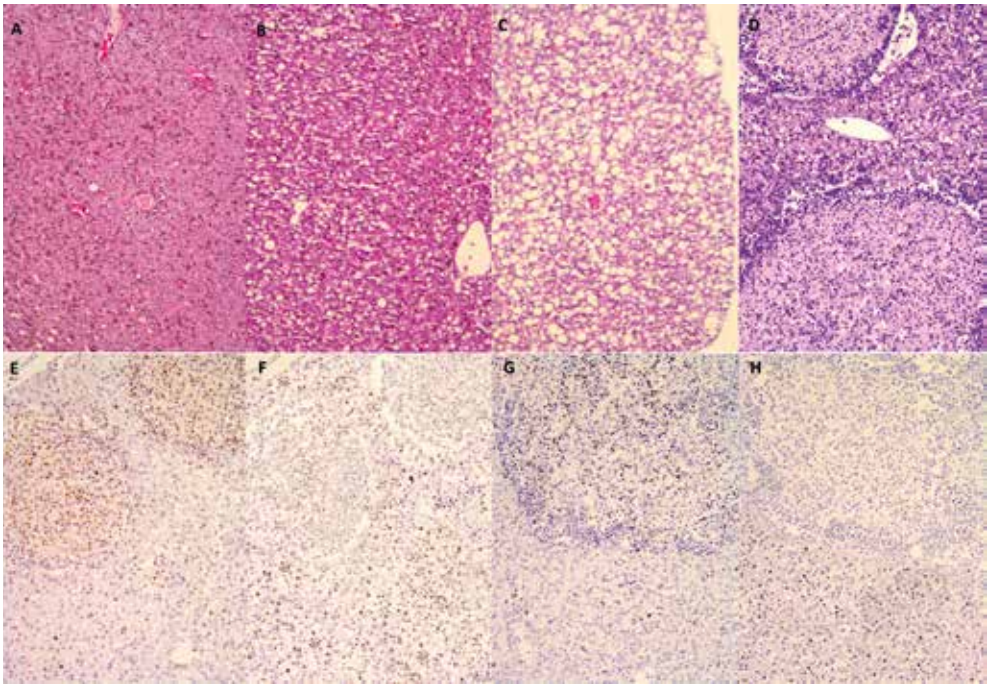


Fig 2. Modificazione patologiche e valutazioni immunoistochimiche nel fegato di *N. furzeri*. A) fegato di *N. furzeri* MZM3 (14sett/restrizione calorica) (colorazione Ematossilina-Eosina); B) fegato di *N. furzeri* MZM3 (14sett/controllo) (colorazione Ematossilina-Eosina) ; C) fegato di *N. furzeri* MZM3 (21sett/controllo) (colorazione Ematossilina-Eosina); D) fegato di *N. furzeri* GRZ (11sett/controllo): due imponenti masse tumorali (epatocarcinomi) sono presenti nel contesto del parenchima epatico (colorazione Ematossilina-Eosina); E) esame immunoistochimico con anticorpo anti-Bcl-2, effettuato su fegato di *N. furzeri* MZM3 (21sett/controllo), F) T.U.N.E.L. effettuato su fegato di *N. furzeri* MZM3 (21sett/controllo); G) espressione immunoistochimica dell'antigene PCNA su fegato di *N. furzeri* MZM3 (21sett/controllo); H) espressione immunoistochimica di p53 su fegato di *N. furzeri* MZM3 (21sett/controllo).

sangue periferico, dalla porzione eritropoietica del rene e dalla milza dei pesci, campionati a tempi prestabiliti a partire dalla maturità sessuale sino al termine presunto della in base al ceppo utilizzato. Le cellule isolate sono state stimolate con *Phorbol-myristato* (PMA) e quindi il "*burst*" respiratorio è stato valutato in base alla capacità di determinare il viraggio del NitroBludi Tetrazolio (NBT) da parte delle cellule. La reazione colorometrica ha permesso di misurare in termini di densità ottica l'entità della risposta. I risultati hanno dimostrato chiaramente come nei pesci controllo, soprattutto a vita più breve (ceppo GRZ), vi sia un declino molto accentuato e veloce dell'attività di *binding* e di *killing* antigenico da parte delle cellule della serie bianca; questo effetto appare fortemente attenuato-limitato dall'integrazione alimentare con resveratrolo e dalla restrizione calorica. (Di Cicco, 2014).

Di contro, in un altro studio, si è evidenziato chiaramente come, al calare della funzione di "sorveglianza" del sistema immunitario età-dipendente, operata dalle cellule del sistema

monocito-macrofagico, vi sia un forte incremento nello sviluppo di tumori solidi in differenti organi, primi tra tutti fegato, rene e pancreas (Di Cicco *et al*., 2011). L'incremento dei tumori appare correlato a un incremento del grado di degenerazione cellulare degli organi colpiti (steatosi, rigonfiamento torbido) e, nelle aree trasformate, una up-regolazione di proteine anti-apoptotiche quali Bcl2, una diminuzione dell'indice apoptotico (% di nuclei positivi al T.U.N.E.L.), una forte diminuzione dell'espressione della proteina p53, e un incremento dei marker di proliferazione (PCNA e Ki67) (Di Cicco *et al*., 2011) (fig. 2).

Sui medesimi ceppi di pesci è stata poi condotta una ricerca correlata alla cancerogenesi, all'invecchiamento e alla degenerazione legate alla senescenza, con lo scopo di valutare il sistema di espressione AGE-RAGE. La sigla AGE (*Advanced glycation end-products*) indica i prodotti finali della glicosilazione avanzata; tali prodotti si generano al termine di una catena di reazioni chimiche successive alla reazione di glicazione iniziale, durante le quali si generano prodotti intermedi quali le basi di Shiff, i prodotti di Mallard e molti altri. Gli AGE si formano continuamente negli organismi attraverso il normale metabolismo. Sotto alcune condizioni patologiche (stress ossidativo dovuto a iperglicemia in corso ad esempio di diabete, carenza di antiossidanti, dieta troppo ricca di grassi saturi e povera di antiossidanti) la formazione di AGE può incrementare oltre i livelli normali. Gli AGE possono essere più reattivi rispetto agli zuccheri iniziali da cui si sono formati. Molte cellule quali quelle endoteliali, la muscolatura liscia e le cellule del sistema immunitario, ma anche gli alveolociti, gli epatociti, le cellule tubulari del rene e i leucociti del sangue periferico hanno recettori specifici per la glicazione finale (RAGE). In condizioni di sovrapproduzione, gli AGE vanno a legarsi ai RAGEs svolgendo differenti funzioni quali ad esempio quella di mediatori proinfiammatori, effetto carcinogenico, effetto neurodegenerativo, effetto inducente la fibrillogenesi e l'amiloidosi, ecc. In definitiva un incremento del sistema AGE-RAGE contribuisce allo sviluppo di malattie infiammatorie croniche in relazione all'età e a fattori di rischio (familiarità, ipertensione, glicemia elevata, ipercolesterolemia, ecc.) quali l'arteriosclerosi, l'asma, l'artrite, l'infarto miocardico, la nefropatia, nonché le retino- e periodontopatie. Nei vari ceppi testati di *Nothobranchius*, il sistema AGE-RAGE appare ben conservato e, se i pesci sono sottoposti a dieta molto ricca o ipercalorica, il sistema tende a essere over-espresso. Da uno studio effettuato da Di Cicco *et al*. (2009) si è potuto osservare come anche l'espressione del sistema AGE-RAGEs sia età-legato e soprattutto come l'effetto patologico indotto da una overespressione degli AGE sia fortemente contenuto se i pesci sono sottoposti a un regime di restrizione calorica o all'integrazione con resveratrolo (fig. 3). A queste osservazioni, correlate con l'invecchiamento, corrisponde lo sviluppo di una serie di modificazioni patologiche osservabili sia macroscopicamente che istologicamente, sia a livello del sistema cardiocircolatorio che a livello gonadico.

In tre serie differenti di *Notobranchius* derivanti da laboratori rispettivamente italiani, francesi e inglesi, Rossi *et al*. (2011) hanno potuto descrivere lesioni riconducibili a placche aterosclerotiche (anche in avanzata calcificazione centrale), cuscinetti miointimali e *fatty streaks* a localizzazione aortica. A livello miocardico, sempre gli stessi autori hanno descritto condizioni di evidente ipertrofia miocardica ventricolare, con cambiamento della morfologia e delle misure cardiache, nonché riduzione della camera cardiaca ventricolare (fig. 4). Questi reperti, unitamente a vari gradi di degenerazione miocardica e di endocardiosi valvolare, appaiono indicatori indiretti di una patologia ipertensiva cronica che, curiosamente, è stata osservata più frequentemente nelle femmine vecchie piuttosto che nei maschi, in controtendenza con quanto si osserva nell'uomo.

La validazione del modello *Nothobranchius* per gli studi di patologia cardiovascolare e di aterogenesi in generale, deriva anche dal lavoro di Wang *et al*. (2014) in cui si descrive in *Nothobranchius*, similmente a quanto descritto nell'uomo, la variazione del gene apoE, co-

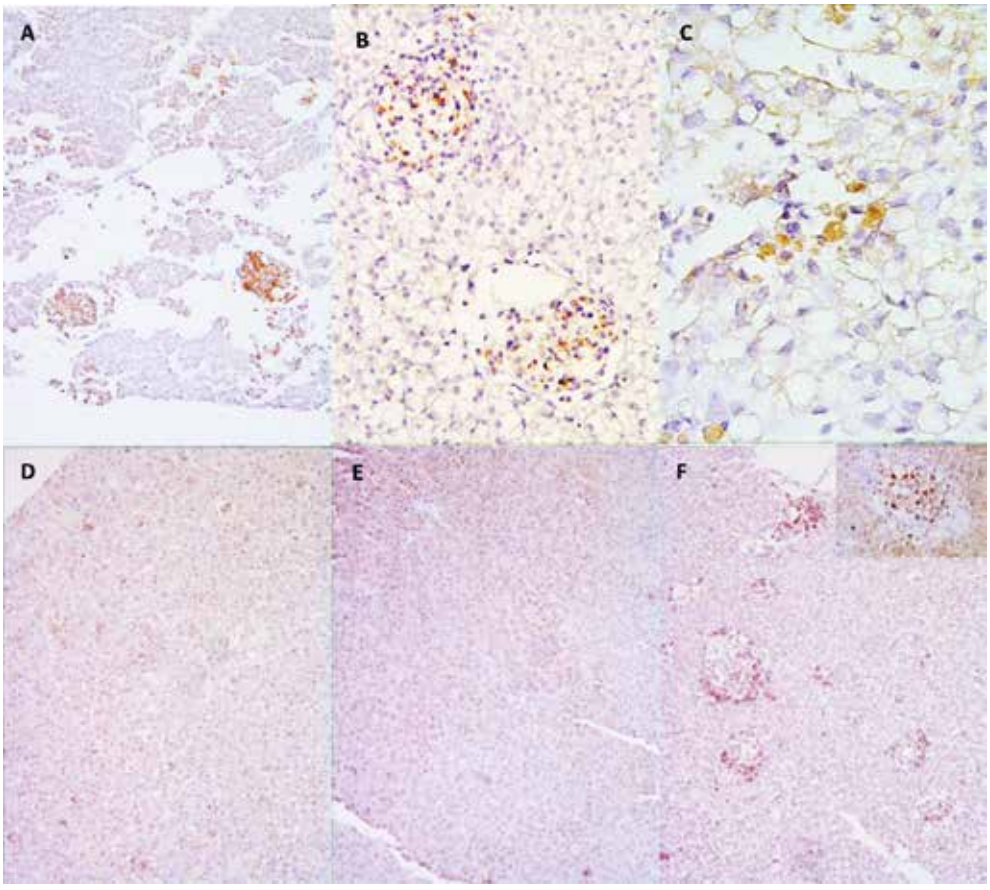


Fig 3. Valutazione immunoistochimica dell'espressione di AGEs e RAGE in fegato di *N. furzeri*. A) cellule neoplastiche (epatocarcinoma) positive per AGEs in *N. furzeri* MZM3 (21sett/controllo); B) cellule neoplastiche (epatocarcinoma) positive per AGEs in *N. furzeri* GRZ (14sett/controllo); C) particolare delle cellule neoplastiche (epatocarcinoma) positive per AGEs in *N. furzeri* GRZ (14sett/controllo). D) membrane cellulari di epatociti steatosici e cellule paraneoplastiche fortemente esprimenti RAGEs in *N. furzeri* GRZ (5 sett/controllo). E) fegato di *N. furzeri* GRZ (11sett/restrizione calorica); F) fegato di *N. furzeri* GRZ (11sett/controllo). Notare le numerose masse tumorali (epatocarcinomi) esprimenti RAGEs. Nell'inserto si possono visualizzare, nel dettaglio, le cellule neoplastiche che esprimono in maniera marcata l'antigene RAGE.

dificante per l'analoga apolipoproteina che è stata riportata essere associata con la longevità. La mutazione della proteina sarebbe inoltre correlata all'insorgenza di malattie età-dipendenti come l'aterosclerosi, la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson. Wang *et al*. (2014) dimostrano che il gene apoE *N. furzerii* (NapoE), codifica per una proteina di 262 amminoacidi, che condivide caratteristiche strutturali comuni con la apoE dei mammiferi. Tale lipoproteina, al pari di ApoE umana, è capace di inibire l'ossidazione delle LDL, ed è il dominio

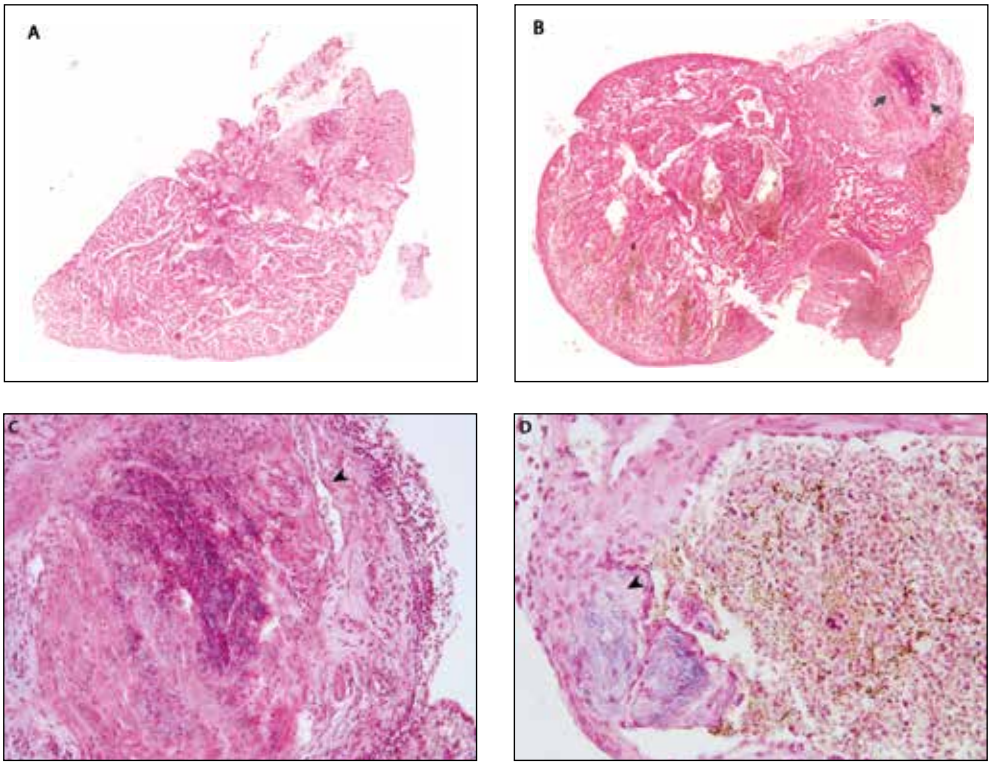


Fig. 4. Vari gradi di ipertrofia cardiaca correlati all'età e allo sviluppo di vasculopatie/ipertensione in *N. furzerii* GRZ di 7 e 14 settimane di età. A) sezione longitudinale di cuore normale di *N. furzerii* di 14 settimane e B) sezione longitudinale di cuore di *Notobranchius* della stessa età con evidente ipertrofia miocardica sinistra (cuore a palla). Si noti il miocardio ipertrofico a livello ventricolare, con totale alterazione della silouette cardiaca e la forte degenerazione dei miocardiociti. Si osservi anche l'alterazione del cono aortico, con calcificazione e riduzione del lume vasale (freccia) (colorazione Ematossilina-Eosina; 2 X). C) particolare del cono aortico, con evidente riduzione del lume aortico per un processo di riendotelizzazione di un trombo. Si nota come il trombo sia andato incontro a necrosi centrale e a calcificaziione distrofica. (colorazione Ematossilina-Eosina; 10X). D) particolare della valvola atrio-ventricolare sinistra: endocardiosi con alterazione del profilo della valvola e con deposito di connettivo in sede sub-endocardica (colorazione di Masson; 40X).

N-terminale di NapoE con residui di lisina o arginina che gioca un ruolo chiave nell' inibizione dell'ossidazione delle LDL. NapoE è prevalentemente espressa nel fegato di *N. guentheri*, coerentemente con quella dei mammiferi. Ancora più importante è stata poi la dimostrazione della *down-regulation* età-dipendente del gene NapoE, rendendolo un adeguato biomarker dell'invecchiamento.

L'invecchiamento e la degenerazione dei parenchimi, compresi gli organi a funzione immunitaria, si accompagna anche al declino della funzione riproduttiva che, nei vari ceppi analizzati, mostra la sua massima espressione nei fenomeni degenerativi e a stampo fibrotico

che interessano soprattutto i testicoli. In molti casi, nelle fasi più avanzate della vecchiaia, i maschi di *Nothobranchius* mostrano ipo- o azospermia, fibrosi testicolare associati alla formazione di granulomi spermatici. Nelle femmine invece il processo di decremento della fertilità si associa a ooforiti o forte necrosi dei follicoli immaturi (Di Cicco *et al*., 2011). Anche questi ultimi aspetti presentano ottime prospettive applicative nello studio del declino della fertilità dell'uomo età-dipendente.

c) Influenza dei fattori ambientali sulla longevità

Un'ultima applicazione molto interessante del modello *Nothobranchius* negli studi di senescenza e nella valutazione dei fattori che possono influenzare la velocità e la qualità dell'invecchiamento organico deriva da Valenzano *et al*. (2006) che per primi hanno valutato come non solo le modificazioni dietetiche o farmacologiche, ma anche le condizioni ambientali, possano modificare l'invecchiamento organico.

In particolare si è studiato l'effetto della variazione della temperatura dell'acqua sui processi di senescenza. Le variazioni di temperatura sono infatti note per determinare una modulazione nel processo di invecchiamento, soprattutto negli organismi poichilotermi come insetti, pesci, anfibi e rettili. Negli invertebrati, la temperatura influenza la durata della vita modulando l'indice di accelerazione età-dipendente del tasso di mortalità, che si crede rifletta il danno da accumulo collegato all'età.

Nella ricerca di Valenzano *et al*. sono stati studiati gli effetti della temperatura sulla cinetica di invecchiamento, sui deficit comportamentali legati all'invecchiamento e sull'espressione di marcatori istologici di senescenza. In pratica i risultati dello studio hanno evidenziato che: (i) l'abbassamento della temperatura delle vasche di allevamento da 25 a 22°C aumenta sia la durata della vita media che massima; (ii) l'allungamento della vita è associato a una drastica riduzione del tasso di mortalità in tutte le fasi della vita di *Nothobranchius*; (iii) l'abbassamento della temperatura da 25 a 22°C ritarda l'insorgenza di deficit locomotori e di apprendimento legati all'età; e (iv) un abbassamento della temperatura da 25 a 22°C riduce l'accumulo di lipofuscine, marker correlato all'età, sia nel fegato che nel rene e cervello.

In conclusione il modello *Nothobranchius* ha dimostrato che anche fattori estrinseci all'animale, strettamente ambientali quali l'abbassamento della temperatura dell'acqua, possono ritardare il tasso di accumulo del danno cellulare/organico età-dipendente.

Conclusioni

Dieci anni fa, il Dott Alessandro Cellerino della Scuola Normale Superiore di Pisa e il suo gruppo di ricerca, con il quale ho ampiamente collaborato, mostrarono al mondo che piccoli pesci esotici del genere *Nothobranchius* sono i vertebrati dalla vita più breve, vivendo solo pochi mesi anche in laboratorio e mostrando un ciclo vitale completo ma estremamente accelerato. E' stato dimostrato che l'invecchiamento di *N. furzeri* può essere rallentato da sostanze naturali o da "stili di vita" particolari: l'interesse per questi pesci non è quindi legato solo a una curiosità zoologica, quanto alla possibilità unica di facilitare lo studio dei processi che regolano il ciclo di vita degli organismi superiori grazie a un prezioso modello animale.

In questi dieci anni, oltre venti laboratori nel mondo hanno costituito e stabilizzato colonie di *N. furzeri* nella convinzione che, grazie alla loro breve aspettativa di vita, questi pesci possano accelerare il progresso della conoscenza sui meccanismi genetici e cellulari dell'invecchiamento.

Bibliografia

- Baumgart M., Di Cicco E., Rossi G., Cellerino A., Terzibasi Tozzini E. (2015). Comparison of captive lifespan, age-associated liver neoplasias and age-dependent gene expression between two annual fish species: Nothobranchius furzeri and Nothobranchius korthause. Biogerontology 16: 63-69
- Berois, N., Arezo, M. J. & de S´a, R. O. (2014). The Neotropical genus Austrolebias: an emerging model of annual killifishes. Seminars in Cell and Developmental Biology , 2.
- Bla˘zek, R., Pola˘cik, M. & Reichard, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. EvoDevo 4, 24.
- Di Cicco E. (2014). Immune system modifications and immunohistological characterization of neoplastic lesions in Nothobranchius sp. Symposium "From bush to bench: 10 years of Nothobranchius furzeri as a model system in biology". Pisa (IT) – Scuola Normale.
- Di Cicco E., Cellerino A., Terzibasi E., Renzoni G., Rossi G. (2009). AGE-RAGE system and apoptosis-related markers expression in age-related liver pathologies and spontaneous tumorigenesis in the shortest-lived vertebrate Turquoise Killifish (Nothobranchius furzeri, Jubb 1971). Proc. Abcam "Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases" Conference, Puerto Vallarta, July 2009.
- Di Cicco E., Terzibasi Tozzini E., Rossi G., Cellerino A. (2011). The short-lived annual fish Nothobranchius furzeri shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. Exp Gerontol 46: 249-256
- Froese R. & Pauly D. (eds) (2014). FishBase. World Wide Web electronic publication. Available at www.fishbase.org, accessed Nov 2014
- Genade T. (2015). Does Nothobranchius furzeri Gonarezhou die from a Parkinson's-like Disease? Biochemistry. June 10, 1-18.
- Hartmann N, Reichwald K, Lechel A, Graf M, Kirschner J, Dorn A, Terzibasi E, Wellner J, Platzer M, Rudolph KL, Cellerino A, Englert C. (2014). Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Biogerontology. Jun;15(3):233-43.
- Horn T., Robertson BC., and NJ Gemmell. (2009). The use of telomere length in ecology and evolutionary biology. Mech Ageing Dev. May; 130(5):290-6.
- Liu T., Qi H., Long M., Liu Z., Fu H., Zhu W., Song T., Yang B., and Li G. (2015) Resveratrol Attenuates Oxidative Stress and Extends Life Span in the Annual Fish Nothobranchius guentheri. Rejuvenation Research Volume 18, Number 3.
- Lucas-Sánchez A., Almaida-Pagán PF, Mendiola P, de Costa J. (2014).Nothobranchius as a model for aging studies. A review. Aging Dis. Aug; 5(4): 281–291.
- Naiman R.J., Gerking S.D., Ratcliff T.D. (1973). Thermal environment of a Death Valley pupfish. Copeia, 366 – 369.
- Nico, L. G. & Thomerson, J. E. (1989). Ecology, food habits and spatial interactions of Orinoco Basin annual killifish. Acta Biologica Venezuelica 12, 106–120.
- Pola˘cik, M., Donner, M. & Reichard, M. (2011). Age structure of annual Nothobranchius fishes in Mozambique: is there a hatching synchrony? Journal of Fish Biology 78, 796–809.
- Rossi G. (2014). Age-related morphological and histopathological modifications in cardiovascular system and in NCS, liver and hematopoietic tissue in Nothobranchius spp. Symposium "From bush to bench: 10 years of Nothobranchius furzeri as a model system in biology". Pisa (IT) – Scuola Normale.
- Taylor D.S., Turner B.J., Davis W.P., Chapman B.B. (2008). A novel terrestrial fish habitat inside emergent logs. American Naturalist 171, 263 – 266.
- Terzibasi E, Valenzano DR, Cellerino A. (2007). The short-lived fish Nothobranchius furzeri as a new model system for aging studies. Exp Gerontol. Jan-Feb;42(1-2):81-9.

- Valdesalici S. and Cellerino A. (2003). Extremely short lifespan in the annual fish Nothobranchius furzeri Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.) 270: 189–191.
- Valenzano D.R., Terzibasi E., Genade T., Cattaneo A., Domenici L. & Cellerino A. (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Current Biology, 16:296–300.
- Valenzano DR., Terzibasi E., Cattaneo A., Domenici L., and Cellerino A. (2006). Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish Nothobranchius furzeri. Aging Cell. Vol. 5, 275–278.
- Wang X., Shang X, Luan J, Zhang S. (2014). Identification, expression and function of apolipoprotein E in annual fish Nothobranchius guentheri: implication for an aging marker. Biogerontology. Jun;15(3):233-43.
- Valdesalici S. and Cellerino A. (2003). Extremely short lifespan in the annual fish Nothobranchius furzeri Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.) 270: 189–191.
- Lucas-Sánchez A., Almaida-Pagán PF, Mendiola P, de Costa J. (2014).Nothobranchius as a model for aging studies. A review. Aging Dis. Aug; 5(4): 281–291.
- Baumgart M., Di Cicco E., Rossi G., Cellerino A., Terzibasi Tozzini E. (2015). Comparison of captive lifespan, age-associated liver neoplasias and age-dependent gene expression between two annual fish species: Nothobranchius furzeri and Nothobranchius korthause. Biogerontology 16: 63-69
- Di Cicco E., Terzibasi Tozzini E., Rossi G., Cellerino A. (2011). The short-lived annual fish Nothobranchius furzeri shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. Exp Gerontol 46: 249-256
- Taylor D.S., Turner B.J., Davis W.P., Chapman B.B. (2008). A novel terrestrial fish habitat inside emergent logs. American Naturalist 171, 263 – 266.
- Naiman R.J., Gerking S.D., Ratcliff T.D. (1973). Thermal environment of a Death Valley pupfish. Copeia, 366 – 369.
- Froese R. & Pauly D. (eds) (2014). FishBase. World Wide Web electronic publication. Available at www.fishbase.org, accessed Nov 2014
- Polaˇcik, M., Donner, M. & Reichard, M. (2011). Age structure of annual Nothobranchius fishes in Mozambique: is there a hatching synchrony? Journal of Fish Biology 78, 796–809.
- Blaˇzek, R., Polaˇcik, M. & Reichard, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. EvoDevo 4, 24.
- Nico, L. G. & Thomerson, J. E. (1989). Ecology, food habits and spatial interactions of Orinoco Basin annual killifish. *Acta Biologica Venezuelica* 12, 106–120.
- Berois, N., Arezo, M. J. & de S´a, R. O. (2014). The Neotropical genus Austrolebias: an emerging model of annual killifishes. Seminars in Cell and Developmental Biology , 2.
- Terzibasi E, Valenzano DR, Cellerino A. (2007). The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. Exp Gerontol. Jan-Feb;42(1-2):81-9.
- Genade T. (2015). Does Nothobranchius furzeri Gonarezhou die from a Parkinson's-like Disease? Biochemistry. June 10, 1-18.
- Valenzano D.R., Terzibasi E., Genade T., Cattaneo A., Domenici L. & Cellerino A. (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Current Biology, 16:296–300.
- Liu T., Qi H., Long M., Liu Z., Fu H., Zhu W., Song T., Yang B., and Li G. (2015) Resveratrol Attenuates Oxidative Stress and Extends Life Span in the Annual Fish Nothobranchius guentheri. Rejuvenation Research Volume 18, Number 3.
- Horn T., Robertson BC., and NJ Gemmell. (2009). The use of telomere length in ecology and evolutionary biology. Mech Ageing Dev. May; 130(5):290-6.

– Hartmann N, Reichwald K, Lechel A, Graf M, Kirschner J, Dorn A, Terzibasi E, Wellner J, Platzer M, Rudolph KL, Cellerino A, Englert C. (2014). Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. Biogerontology. Jun;15(3):233-43.
– Wang X., Shang X, Luan J, Zhang S. (2014). Identification, expression and function of apolipoprotein E in annual fish *Nothobranchius guentheri*: implication for an aging marker. Biogerontology. Jun;15(3):233-43.
– Di Cicco E., Cellerino A., Terzibasi E., Renzoni G., Rossi G. (2009). AGE-RAGE system and apoptosis-related markers expression in age-related liver pathologies and spontaneous tumorigenesis in the shortest-lived vertebrate Turquoise Killifish (*Nothobranchius furzeri*, Jubb 1971). Proc. Abcam "*Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases*" Conference, Puerto Vallarta, July 2009.
– Di Cicco E. (2014). Immune system modifications and immunohistological characterization of neoplastic lesions in *Nothobranchius* sp. Symposium "From bush to bench: 10 years of *Nothobranchius furzeri* as a model system in biology". Pisa (IT) – Scuola Normale.
– Rossi G. (2014). Age-related morphological and histopathological modifications in cardiovascular system and in NCS, liver and hematopoietic tissue in *Nothobranchius* spp. Symposium "From bush to bench: 10 years of *Nothobranchius furzeri* as a model system in biology". Pisa (IT) – Scuola Normale.
– Valenzano DR., Terzibasi E., Cattaneo A., Domenici L., and Cellerino A. (2006). Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. Aging Cell. Vol. 5, 275–278.

IL CANE QUALE MODELLO SPONTANEO PER LO STUDIO DELLE MALFORMAZIONI CARDIACHE EREDITARIE DELL'UOMO

FRANCO GUARDA[1], ILARIA BIASATO[2], DOMENICO BARONE[3]

[1] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; [2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; [3] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Il problema dello studio sulle malformazioni cardiache, sia nell'uomo che negli animali, è molto complesso, poiché sono più di cento quelle conosciute la cui origine, per molte di esse, è ancora *sub iudice*.

Innanzitutto, per definizione, le malformazioni cardiache si riferiscono a difetti della struttura cardiaca presenti alla nascita, le quali si possono manifestare clinicamente dopo il parto oppure più avanti nella vita.

Di molte malformazioni del cuore si conosce una causa ereditaria, mentre per altre si suppone una concausa ambientale che influisce sulla variabilità dei caratteri ereditari.

D'altra parte, è necessario ricordare ancora che tali lesioni cardiache possono avvenire per mutazioni occasionali che indicano il danno del DNA per svariati fattori.

Infine, numerose sostanze chimiche, fisiche e agenti biologici possono avere un'influenza diretta sullo sviluppo embriologico del cuore. Purtroppo tali informazioni sono ancora del tutto insufficienti.

Dal punto di vista generale, le malformazioni cardiache sono conosciute in tutte le specie animali e studiate, particolarmente, nel cane, per la molteplicità delle razze, per la facilità di allevamento e di riproduzione e per la conoscenza del profilo genetico nelle oltre 400 razze selezionate. La frequenza è maggiore nelle razze pure rispetto agli incroci. Le indagini condotte su questa specie hanno dimostrato che le malformazioni più frequenti sono rappresentate dai difetti ereditari oppure da mutazioni e sono determinate da specifici fattori genetici (Michaelsson e Siew Yen, 2000; Oliveira *et al*., 2011).

Sempre nel cane, tali alterazioni cardiache semplici o complesse si manifestano nel 22% circa dei casi (Oliveira *et al*., 2011) e la relativa patologia è sovrapponibile a quella dell'uomo, la cui frequenza è di circa lo 0,5-0,.8% (Kemell *et al*., 2014). Patterson (1965) e Patterson *et al*. (1971) suppongono che per ogni singola malformazione si tratti degli effetti di un solo gene maggiore con variazione in relazione ad altri loci o con l'ambiente. In generale, i ricercatori pensano che le malformazioni cardiache più frequenti nel cane siano rappresentate da difetti ereditari specifici.

In patologia umana, due fattori eziologici sono di grande importanza, ovvero la base genetica e le sue interazioni con l'ambiente. Le suddette malformazioni costituiscono il 75% di tutti i difetti congeniti del cuore (Pomerance e Davies, 1975).

Sempre nell'uomo, per molto tempo si pensava che le anormalità cromosomiche fossero responsabili per un numero piccolo di malformazioni cardiache. Oggi è risaputo che la proporzione delle anomalie genetiche è molto più alta. In ogni caso, il ruolo dell'ambiente e i fattori genetici non possono essere separati.

Altresì, alcune malattie infettive, come il morbillo delle madri durante la gravidanza, possono provocare malformazioni cardiache nel 50% dei casi, così come l'infezione da Coxsackie virus tipo B e il talidomide (Gregg, 1941; Rowe, 1963).

La frequenza delle malformazioni cardiache varia a seconda degli studi. Ad esempio, nell'uomo, secondo Muir (1960), le malformazioni più frequenti sono quelle riportate in tab. 1.

Tabella 1. Malformazioni più frequenti nell'uomo (Muir, 1960)

Malformazione	*Frequenza*
Difetti settali ventricolari	23,1%
Difetti settali atriali	11,9%
Dotto arterioso persistente	11,4%
Tetralogia di Fallot	10,4%
Stenosi polmonare	8%
Complesso di Eisenmenger	3,9%

In tab. 2 è riportata la frequenza delle malformazioni cardiache nel cane, secondo Detweiler e Patterson (1965) e Oliveira *et al*. (2011).

Tab. 2. Frequenza delle malformazioni cardiache nel cane (Detweiler e Patterson, 1965;Oliveira *et al*., 2011).

Malformazione	*Detweiler e Patterson (1965)*	*Oliveira et al. (2011)*
Dotto arterioso persistente	28%	20,9%
Stenosi polmonare	20%	32,1%
Stenosi aortica	14%	21,3%
Persistenza dell'arco aortico destro	8%	0,3%
Difetto del setto interventricolare	7%	7,5%
Tetralogia di Fallot	Inferiore al 5%	1,0%
Difetto del setto interatriale	Inferiore al 5%	1,1%

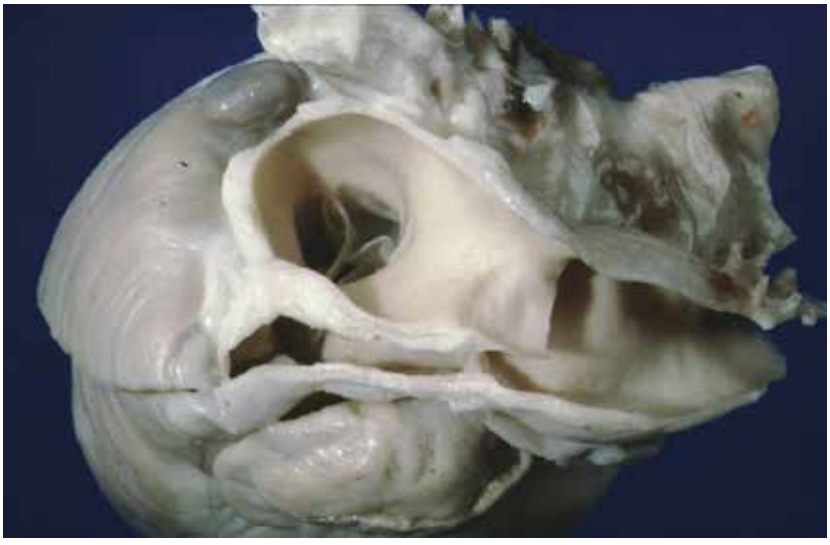


Fig. 1. Cane, cuore. Persistenza del dotto arterioso (PDA).

In tab. 3 sono elencate le malformazioni cardiache ereditarie riconosciute nelle varie razze di cani.

Tab. 3. Malformazioni cardiache ereditarie riconosciute nelle varie razze di cani

Malformazione	*Caratteristiche*	*Razze colpite*
Dotto arterioso persistente (fig. 1)	Modalità di trasmissione complessa	Chihuahua (Bomassi *et al*., 2011), Collie, Pastore Tedesco, Labrador Retriever, Maltese, Barboncino, Shetland Sheepdog, Yorkshire Terrier
Stenosi polmonare (figg. 2-3)	Modalità di trasmissione complessa. Carattere autosomico recessivo nel Golden Retriever (Arndt *et al*., 2012)	Golden Retriever (Arndt et al., 2012), Terrier Airedale, Chihuahua, Bulldog, Mastino, Samoiedo, Schnauzer, Terrier
Stenosi aortica (fig. 4)	Carattere autosomico dominante. Carattere autosomico recessive nel Dogue de Bordeaux (Ohad *et al*., 2013)	Boxer, Pastore Tedesco, Pointer, Golden Retriever, Danese, Rottweiler, Samoideo, Dogue de Bordeaux (Ohad *et al*., 2013)
Difetto del setto interventricolare (figg. 5-6)	Carattere autosomico recessivo. Sospetta mutazione eterozigote (Lee e Hyun, 2009)	Bulldog, Beagle (Diez-Prieto *et al*., 2009)
Tetralogia di Fallot (fig. 7)	Carattere autosomico recessivo	Bulldog
Difetto del setto interatriale	Sospetta mutazione genetica (Lee *et al*., 2007)	Dobermann, Pinscher
Persistenza dell'arco aortico destro	Modalità di trasmissione complessa. Carattere autosomico recessivo Aberrazione cromosomica nel Pinscher (Philipp *et al*., 2011)	Pastore Tedesco, Danese, Pinscher (Philipp *et al*., 2011)

In futuro, sia nell'uomo sia nel cane, le ricerche biomolecolari e sul DNA in associazione con lo studio epidemiologico della discendenza famigliare potranno meglio chiarire le relative cause delle malformazioni cardiache, così come gli stessi studi sulle diverse razze di cani nei quali è più facile la riproduzione incrociata dei soggetti parentali potranno portare un importante contributo alla migliore conoscenza delle cause delle malformazioni cardiache.

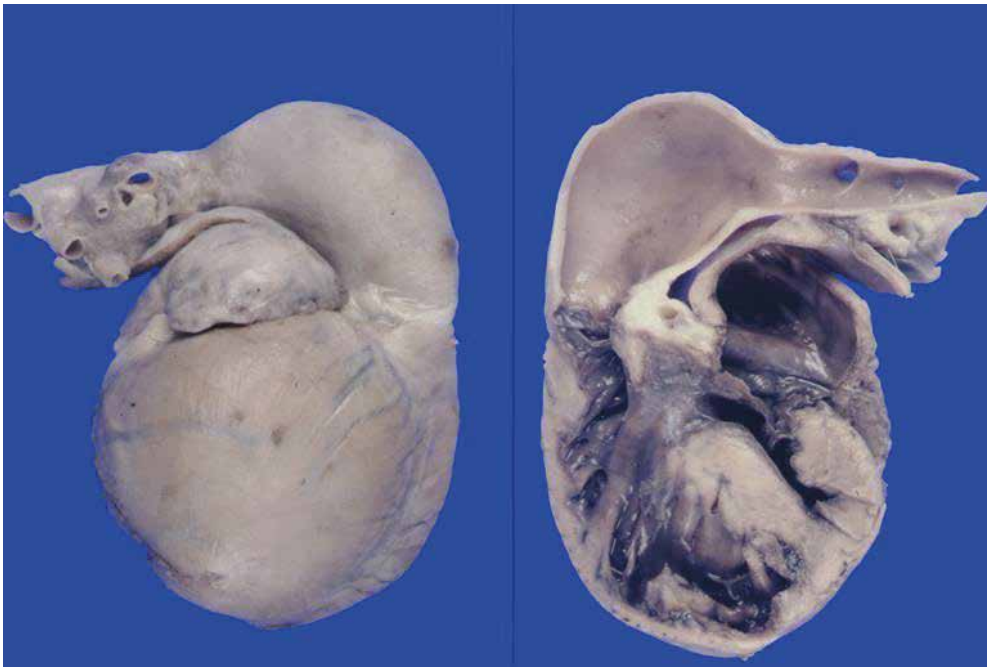


Fig. 2. Cane, cuore. Stenosi sub valvolare dell'arteria polmonare con dilatazione post-stenotica del primo tratto.

Fig. 3. Cane, cuore. Stenosi polmonare (SP).

Fig. 4. Cane, cuore. Stenosi subaortica (SSA).

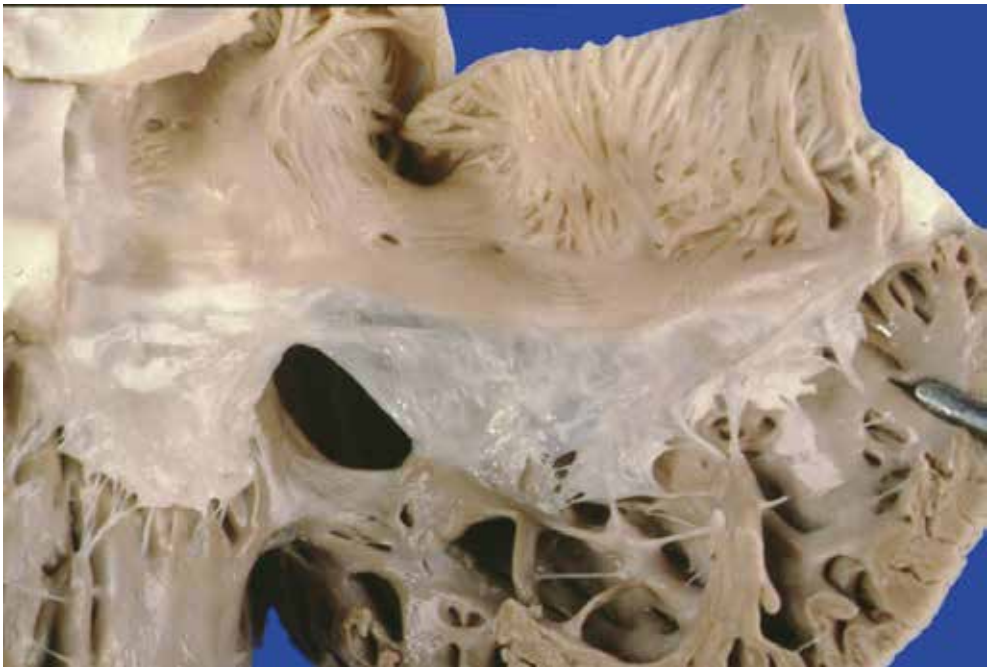


Fig. 5. Cane, cuore. Ampio difetto del setto interventricolare (DIV).

Fig. 6. Cane, cuore. Difetto del setto interventricolare (DIV) di piccole dimensioni. Si osserva, altresì, una moderata dilatazione del primo tratto dell'aorta ascendente.

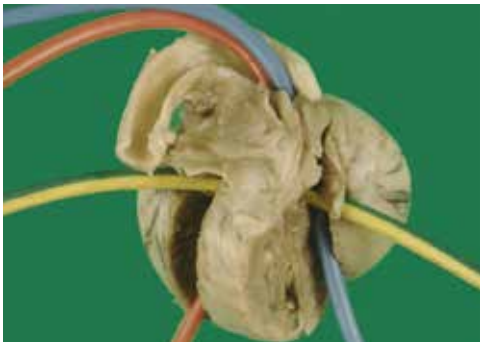


Fig. 7. Cane, cuore. Tetralogia di Fallot.

Bibliografia

- Campbell M. Common malformations of the heart. Guys Hosp Rep. 1967;116:341-9.
- Detweiler D.K., Patterson D.F. The prevalence and types of cardiovascular disease in dog. Ann. New York Acad. Sci 1965;127:481.
- Gregg N.M. Congenital cataract following German measles in the mother. 1941. Epidemiol Infect. 1991;107:iii-xiv.
- Kernell K., Sydsjo G., Bladh M, Josefsson A. Congenital heart disease in men – birth characteristics and reproduction: a national cohort study. BMC Pregnancy Childb 2014;14:187.
- Michaelsson M., Sien Yen H. Congenital heart malformations in mammals. Imperial College Press, London, 2000.
- Muir C.S. Incidence of congenital heart disease in Singapore. Br Heart J. 1960;22:243-54.
- Oliveira P., Domenech O., Silva J., Vannini S., Bussadori R., Bussadori C. Retrospective review of congenital heart disease in 976 dogs. J Vet Intern Med. 2011;25:477-83.
- Patterson D.F. Congenital heart disease in the dog. Ann. New York Acad. Sci 1965;127:541.
- Patterson D.F., Ryle R.L., Buchanan J.W., Transvetter E., Art D.A. Hereditary patent ducturs arteriosus and its sequelae in the dog. Circ Res 1971;29:1.
- Pomerance A., Davies M.J. The pathology of heart. Blackwell, Oxford, 1975.

IL COLOMBO WHITE CARNEAU E IL SUINO: MODELLI SPONTANEI PER LO STUDIO DELL'ATEROSCLEROSI UMANA

FRANCO GUARDA[1], DOMENICO BARONE[2], PIETRANGELO PERRONE[3]

[1] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; [2] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino; [3] Medico Veterinario libero professionista

Tra tutti gli animali l'uomo è maggiormente colpito da aterosclerosi e dalle sue complicazioni, avendo raggiunto l'apice del processo evolutivo.

Tra gli scopi della patologia comparata vi è quello di trovare i modelli spontanei che sviluppino lesioni il più possibile simili a quelle note nell'uomo. Per quanto riguarda l'aterosclerosi sono state eseguite da molti anni ricerche in molte specie animali, dai pesci ai mammiferi domestici e selvatici, agli uccelli, ai mammiferi acquatici. Da questi studi sono emersi risultati dai quali risulta che alcuni mammiferi e uccelli possono sviluppare lesioni aterosclerotiche simili a quelle presenti nell'uomo. In generale tali lesioni sono sia proliferative sia degenerative, caratterizzate dalla presenza di miofibroblasti, lipidi, connettivo e altre strutture.

L'aterosclerosi è la risposta proliferativa a fattori patologici ai quali la maggior parte degli animali sono sensibili e che si manifestano con l'accumulo di lipidi. La calcificazione e la trombosi sono secondari al danno iniziale.

Per esempio nelle scimmie antropomorfe, a rischio di estinzione, non si possono più effettuare ricerche sperimentali, anche se sono evidenti molte affinità morfologiche e biochimiche con l'uomo, come è stato dimostrato nel babbuino e nel macaco. Inoltre in almeno 20 specie di questi animali sono state poste in evidenza alterazioni intimali simili a quelle dell'uomo (Stout e Thorge, 1980). Le uniche eccezioni in questo gruppo sono gli uistiti e il macaco nigra nei quali tali lesioni sono rare. Altrettanto il cincillà e il gerbillo della Mongolia non presentano aterosclerosi, anche se possono presentare in condizioni fisiologiche una ipercolesterolemia.

In più di 500 specie di uccelli l'aterosclerosi coronarica è molto meno frequente (1,3%) rispetto a quella aortica (20%) e alcune specie sono più affette di altre: per esempio lo struzzo, il nandu, il pollo e il tacchino.

In questo ambito assume una grande importanza il colombo di razza White Carneau, il quale presenta un'accentuata aterosclerosi, mentre al contrario la razza Slow Racer è molto resistente.

Fig. 1. Gallina (10 anni), aorta: aterosclerosi nella parte addominale.

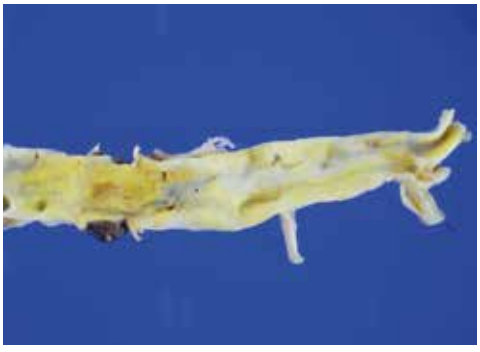


Fig. 2, Gallo, aorta addominale: aterosclerosi.

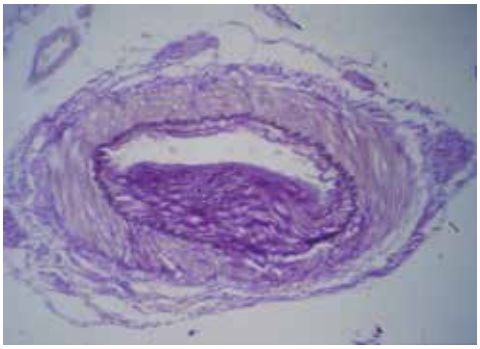


Fig. 3. Suino, arteria coronarica: stenosi del lume per proliferazione muscolo-elastica dell'intima.

Fig. 4. Bovino, aorta: zona terminale focolai di "fatty strikes" intimali.

E' stimato dalla maggioranza degli autori che si sono interessati dell'argomento, che il colombo White Carneau è uno degli animali più utili per lo studio dell'aterosclerosi simile alla malattia dell'uomo (Gresham, 1983).

Infatti in questo animale i lipidi incominciano ad accumularsi nell'intima già durante le prime settimane di vita, e a 4 anni il 100% degli animali presenta evidenti lesioni macroscopiche a carico dell'aorta, e a 8 anni il 70% dei soggetti presenta lesioni lipidiche nelle coronarie.

Altrettanto sono frequenti le rotture degli ateromi con embolismi che interessano il cuore, con conseguenti infarti miocardici, come nell'uomo.

Infine questa razza di colombi rappresenta un ottimo esempio dell'influenza dei fattori genetici nell'aterogenesi, così rara nel mondo animale, così come è utile per lo studio delle alterazioni metaboliche precoci dei vasi aterosclerotici.

Anche una razza di conigli presenta una iperlipemia ereditaria studiata per lo sviluppo dell'aterosclerosi (Watanabe *et al.,* 1977).

Tra gli altri uccelli sono degni di interesse il tacchino e la gallina. Nel primo l'aterosclerosi dell'aorta addominale provoca la sua rottura anche a causa dell'alta pressione sistolica ematica. La rapida crescita di questi animali provoca una diminuzione della formazione dell'elastina nell'aorta, che a sua volta favorisce la migrazione delle cellule muscolari lisce nell'intima (Gresham e Howard, 1961).

E' inoltre interessante notare che nelle galline ovaiole le "fatty strikes" dell'aorta prossimale sono in rapporto alla fluttuazione del colesterolo plasmatico durante la deposizione delle uova.

In generale gli ateromi nei grandi vasi sono più ampi negli uccelli rispetto ai mammiferi.

Tra i mammiferi, i carnivori e gli erbivori tendono a sviluppare meno lesioni in rapporto agli onnivori.

L'elefante africano offre un buon esempio degli effetti del cambiamento dell'habitat sull'incidenza dell'aterosclerosi a causa dell'"habitat disturbato". Infatti negli animali che vivono nelle foreste si osservano soltanto le "fatty strikes" nell'aorta, mentre invece in animali trasportati in zone cespugliose, senza alberi e quindi senza ombra, si osservano ateromi simili a quelli dell'uomo (Sikes, 1968).

Un altro animale molto interessante per lo studio comparato dell'aterosclerosi è il suino, per i seguenti motivi:

1. è un animale onnivoro come l'uomo;
2. esistono analogie anatomiche e fisiologiche con l'uomo dell'apparato cardiovascolare,

Fig. 5. Bovino, aorta toracica: "fatty strikes" in vicinanza dei rami arteriosi.

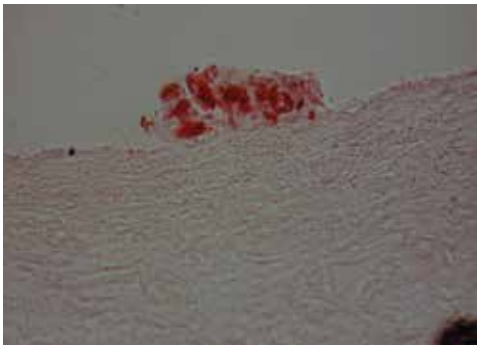


Fig. 6. Vitello, aorta: "fatty strikes" intimali.

3. nel suino sono note le linee genetiche, facili da allevare e con costi economici limitati,
4. l'aterosclerosi aortica e delle coronarie extramurali e intramurali presenta uno sviluppo spontaneo, anche se di entità inferiore all'uomo.

Nel suino l'aterosclerosi colpisce già i giovani animali, e le lesioni delle arterie coronariche sono simili nella distribuzione e struttura a quella dei bambini (French *et al*., 1963).

Altrettanto sono stati descritti ateromi nell'aorta, nelle coronarie e nelle arterie cerebrali in animali con più di un anno di età (Duff e Mc Millan, 1951; Getty, 1965; Luginbuhl e Jones, 1965; Mitschell e Schwartz, 1965) anche se raramente si annoverano complicazioni come nell'uomo.

Infine in patologia umana si considera l'aterosclerosi un problema pediatrico, in quanto sono già osservabili le cosiddette "fatty strikes" in tenera età (Streak, Reisman, 1965; Gresham, 1981). Altrettanto avviene in numerose specie animali compresi gli erbivori.

In conclusione possiamo affermare che per prospettare il futuro delle ricerche su questo interessante problema si dovranno eseguire ricerche su un gran numero di specie animali, in quanto il modello ideale non è ancora apparso all'orizzonte, anche se attualmente sono state identificate alcune specie sia vicine o lontane filogeneticamente dall'uomo che possono presentare lesioni simili a quelle dell'uomo.

Non crediamo che le ricerche sperimentali eseguite negli animali possano risolvere i problemi generali dell'aterogenesi, ma soltanto alcuni punti particolari del processo, poiché i risultati finali degli esperimenti sono più vicini alle malattie d'accumulo che a una aterosclerosi spontanea.

Tanto nell'uomo quanto negli animali le cellule muscolari lisce svolgono un ruolo fondamentale nell'aterogenesi. Stimolate da più fattori, vengono attivate e talvolta trasformate in cellule schiumose, contenenti lipidi. Si moltiplicano e migrano attraverso le fenestrature della membrana elastica interna nello spazio sottoendocardico provocando i cosiddetti cuscinetti intimali muscoloelastici, che possono occludere il lume vasale (Weber e Tanganelli, 1987).

Per l'aterosclerosi sperimentale si tratta di scegliere volta per volta i modelli animali più idonei per cercare di risolvere i temi particolari che più interessano il ricercatore. L'impegno futuro dei ricercatori dovrà essere quindi quello di correlare dal punto di vista comparativo tutti i dati ricavati sino adoggi dalle diverse specie animali dal punto di vista patologico, fisiologico, biochimico e genetico. Infatti il mondo animale, nei riguardi dell'aterogenesi, offre una varietà di lesioni e un'estensione di stimoli di ricerca che sfidano i ricercatori a trovare i comuni denominatori dell'aterosclerosi, che deve essere interpretata come una risposta unica della parete arteriosa a più e differenti stimoli patogeni.

Bibliografia

- De Sa D.J. (1979) – *"Coronary arterial lesions and myocardial necrosis in stillbirths and infants"* – Arch. Dis. Child. 54, 918
- Duff L. e Mc Millan G.C. (1951) – *"Pathology of atherosclerosis"* – Am. J. Med. 11, 92
- Gresham G. A. e Howard A. N. (1961) – *"Aortic rupture in Turkey"* – J. Atheroscl. Res. 1, 75
- Gresham G. A. (1981) – *Atherosclerosis: its origins and development in man"* – in Peeters H., Gresham G. A. e Paoletti R., Arterial pollution, Plenum Press, London, 1981
- Gresham G. A. (1981) – *Animal models of Atherosclerosis"* in Peeters H., Gresham G. A. e Paoletti R., Arterial pollution, Plenum Press, London, 1981
- Gresham G.A. e Paoletti R. – *Arterial pollution* – Plenum Press, London, 1981
- Gresham G. A. (1981) – *Atherosclerosis in animals: comparative aspects"* in Peeters H., Gresham G. A. e Paoletti R., Arterial Pollution, Plenum Press, London, 1981
- Getty R. (1965) – *The gross and microscopic occurrence and distribution of spontaneous Atherosclerosis in the Arteries of Swine* – in Roberts e Straus R., Comparative Atherosclerosis, Hacher e Row, New York, 1965
- Mitschell J. R. A. e Schwartz C. J. (1951) – *Arterial disease* – Blackwell, Oxford
- Luginbühl H. e Jones J. E. T. (1965) – *Atherosclerosis in Swine* – in Roberts J. C. e Straus R., Comparative Atherosclerosis, Hacher Med. Div. Harper e Row, New York, 1965
- Reisman M. J. (1965) – *Atherosclerosis and pediatrics*- J. Pediatrics, 66, 1, 1965
- Sikes S. K. (1968) – *The disturbed habitat and its effect on the health of animal populations with special reference to cardiovascular disease in elephant* – Proc. Roy Soc. Med., 61, 60
- Stout L. C. e Thorpe L. W. (1980) – *Histology of normal aortas in non human primates with emphasis on diffuse intimal thickening* – Atherosclerosis 35, 165
- Vogel H. G. – *Drug discovery and evaluation* - Springer, Berlin, 2002
- Watanabe Y., Ito M. (1977) - *Breeding of a rabbit strain of hiperlipidemia*.- Exp. anim. 26,35.
- Weber G. e Tanganelli P. (1987) – *Aterosclerosi: in Beretta Anguissola A. Trattato delle malattie cardiovascolari* – Utet, Torino, 1987

L'ARTERIOSCLEROSI CORONARICA DEL SALMONE COME MODELLO DI STUDIO DELLE CORONAROPATIE DELL'UOMO

MARCO GALEOTTI

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali.
Sezione di Patologia Veterinaria, Università di Udine

I Teleostei salmonidi (fam. *Salmonidae*) presentano un'elevata incidenza di lesioni cardiache, tra le quali spicca l'arteriosclerosi coronarica, che viene descritta sia nei salmoni selvatici che in quelli allevati. La prevalenza dell'arteriosclerosi dell'arteria coronaria principale è ≥90% nei soggetti selvatici di salmone del Pacifico (*Oncorhynchus nerka*) (Robertson *et al*.,1961a) e nel salmone dell'Atlantico (*Salmo salar*) selvatico o allevato (Saunders *et al*., 1992). Tali riscontri fanno riferimento alla fase di ovodeposizione o al raggiungimento di taglia pari a 90 centimetri. Le caratteristiche della lesione, soprattutto nelle prime fasi di insorgenza, ne fanno un modello di estremo interesse per lo studio delle coronopatie dell'uomo.

Il cuore dei teleostei

Nei Teleostei il cuore è situato caudo-ventralmente alla cavità branchiale nel sacco pericardico e separato dalla cavità addominale da un setto fibroso (*septum trasversum*). E' costituito da 4 camere (fig. 1) così disposte in senso caudo-craniale: seno venoso, atrio, ventricolo e bulbo arterioso. Il seno venoso, la cui parete è molto sottile e di natura connettivale, ospita anche il pacemaker cardiaco inserito nel setto trasverso. L'atrio, anch'esso estremamente sottile, appare di forma irregolare, adattabile alle esigenze funzionali della specie, con un volume pressoché simile a quello del ventricolo. Il ventricolo, formato da una spessa parete muscolare, presenta una porzione compatta più esterna e una spongiosa più interna, costituendo di fatto la vera pompa cardiaca. La sua forma è molto variabile a seconda della specie, ma nei salmonidi è tendenzialmente piramidale. Infine il bulbo arterioso, di colore bianco, è molto consistente e al contempo elastico in quanto è costituito da tessuto fibroelastico e fibre muscolari lisce. Ha una funzione di depulsatore del sangue che proviene dal ventricolo. In un numero ridotto di specie presenta anche tessuto cartilagineo. Il pericardio che avvolge il cuore, rispetto ai mammiferi appare decisamente più resistente, forse per sopportare le forti pressioni che si generano dall'attività del ventricolo (fig. 2).

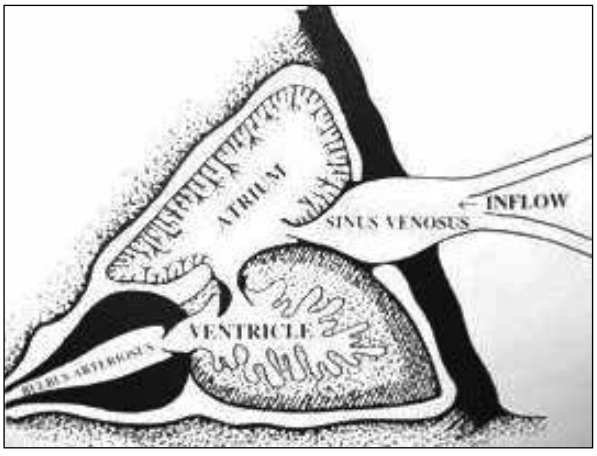


Fig 1. Principali strutture del cuore di un teleosteo. Tratto da: Histopathology Workshop "Cardiovascular pathology in fish" by Trygve T. Poppe, EAFP Meeting, 2007.

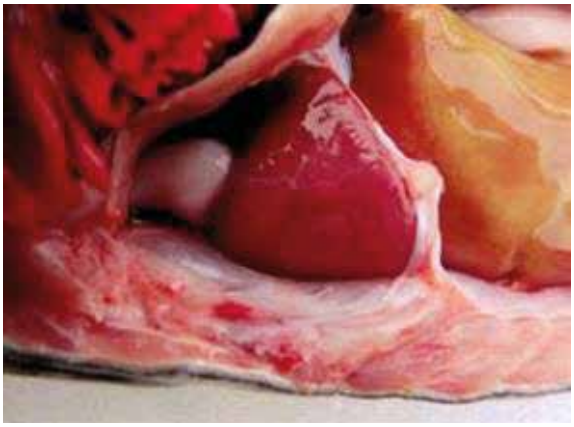


Fig. 2. Posizionamento nella cavità pericardica di cuore normale di salmone dell'Atlantico. A sinistra il bulbo arterioso di colore bianco, a destra il ventricolo di forma piramidale (da: Bruno D.W., Noguera P. A, Poppe T.T., 2013. "A Colour Atlas of Salmonid Diseases". Second Edition. Springer)

Per quanto riguarda le strutture vasali, il principale vaso che irrora il cuore è l'arteria coronaria principale che si colloca sull'aorta ventrale e sul bulbo arterioso biforcandosi in due rami (fig. 3a). Istologicamente è composta da un'intima, costituita da un singolo strato di cellule endoteliali, una lamina elastica continua e ondulata (LE) e una tonaca media costituita da alcuni strati di cellule muscolari lisce vascolari (MLV) (fig. 4a) (Bruno *et al*., 2013).

L'arteriosclerosi coronarica

L'arteriosclerosi coronarica è stata descritta per la prima volta da Robertson *et al*. (1961a) nei salmoni del Pacifico (Gen. *Oncorhynchus*), campionati durante la migrazione finalizzata alla deposizione delle uova. Successivamente la patologia è stata riscontrata anche in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), salmone dell'Atlantico (*Salmo salar*), salmone del Pacifico (*Oncorhynchus nerka*), salmone reale (*Oncorhynchus tshawytscha*) e salmone argentato (*Oncorhynchus kisutch*) (van Citters e Watson, 1968;. Maneche *et al*., 1972;. Moore *et al*., 1976a,b,c; McKenzie *et al*., 1978;. Farrell *et al*., 1986 , 1990a; Kubasch e Rourke, 1990). I salmoni migratori hanno una propensione a sviluppare lesioni coronariche nello stadio adulto, ma queste sono solitamente assenti nei Teleostei non salmonidi (Vastesaeger *et al*., 1965;. Santer, 1985), così come negli Elasmobranchi adulti (Farrell *et al*., 1992a.) Queste osservazioni possono essere interpretate come una predisposizione del salmone all'arteriosclerosi coronarica rispetto alle altre specie di pesci. Per questo motivo i salmoni migratori sono un interessante modello comparativo per lo studio dell'aterosclerosi coronarica umana. Sia il salmone dell'Atlantico sia quello del Pacifico iniziano la loro vita in corsi d'acqua dolce, migrano verso l'oceano per un periodo di crescita e poi ritornano al sito di origine per deporre le uova. Di solito vivono per 3-6 anni e sono sottoposti a una rapidissima senescenza poco dopo la fase di maturazione e deposizione delle uova. La scoperta di lesioni coronariche nel salmone adulto è stata sin dall'inizio intesa come uno dei cambiamenti che caratterizzano la senescenza nel salmone (Robertson e Wexler, 1960;. Robertson *et al*., 1961b).

Descrizione della lesione

L'arteriosclerosi della coronaria principale nel salmone adulto è caratterizzata da proliferazione intimale di cellule muscolari lisce vascolari (MLV), detta anche proliferazione mioin-

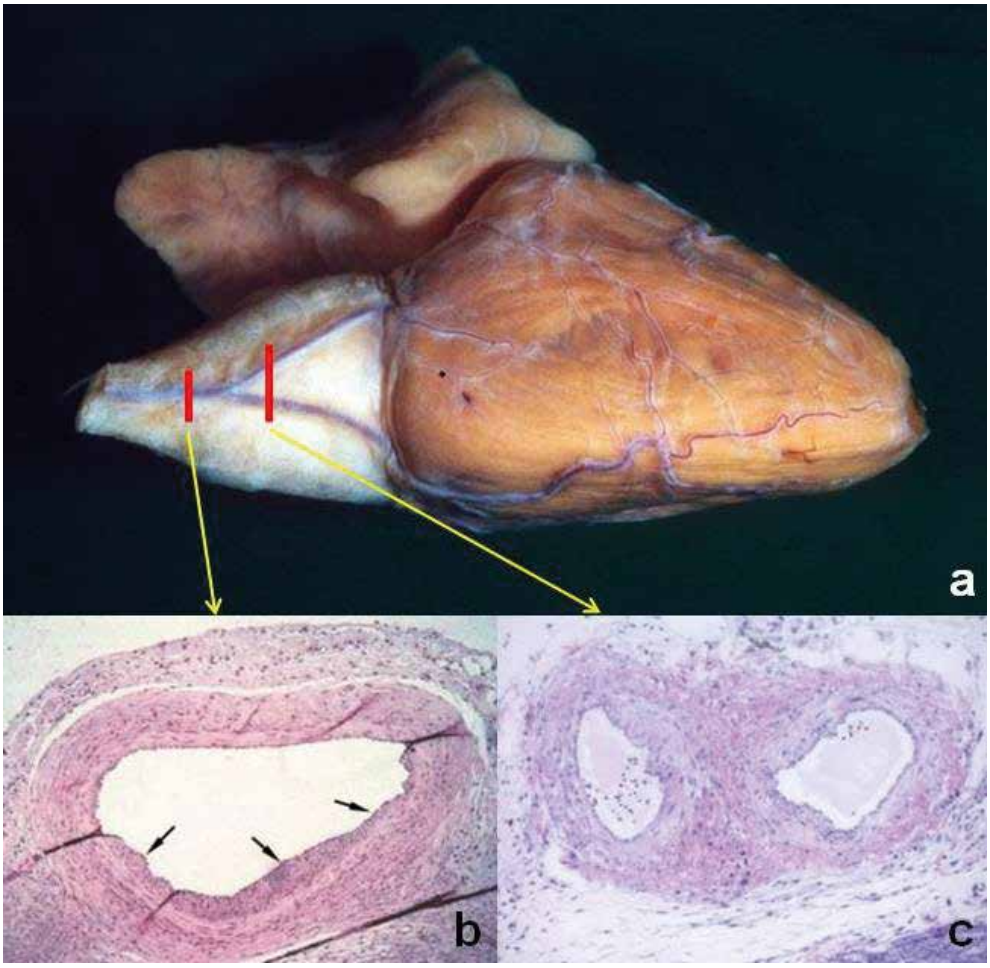


Fig. 3. Cuore di salmone dell'Atlantico allevato (*Salmo salar* L.). (a) Si osserva il bulbo arterioso sul quale scorre l'arteria coronaria principale che si biforca per raggiungere il ventricolo. (b) Sezione trasversale dell'arteria coronaria principale dove è evidente una proliferazione miointimale (frecce) che diventa più pronunciata a livello della biforcazione del vaso (c) (colorazione Ematossilina-Eosina) (da: Poppe T.T., 2007. Histopathology Workshop, "Cardiac diseases in fish", EAFP Meeting Grado)

timale, con progressiva distruzione della lamina elastica (LE) (Farrel, 2002). La lesione può presentare un singolo strato di cellule miointimali proliferate o diversi strati che occupano fino a metà del lume vasale (figg. 4, 5) (Poppe *et al*., 2007; Dalum *et al*., 2016). Nell'area di proliferazione neointimale spesso si osserva la presenza di un'abbondante e densa matrice extracellulare (MEC), nella quale sono incluse cellule MLV, fusiformi e allungate, disposte con orientamento circolare. Si osserva inoltre un aumento dell'acidofilia della MEC della neointima e una diminuzione di colorazione per il collagene, se comparata con la MEC della tona-

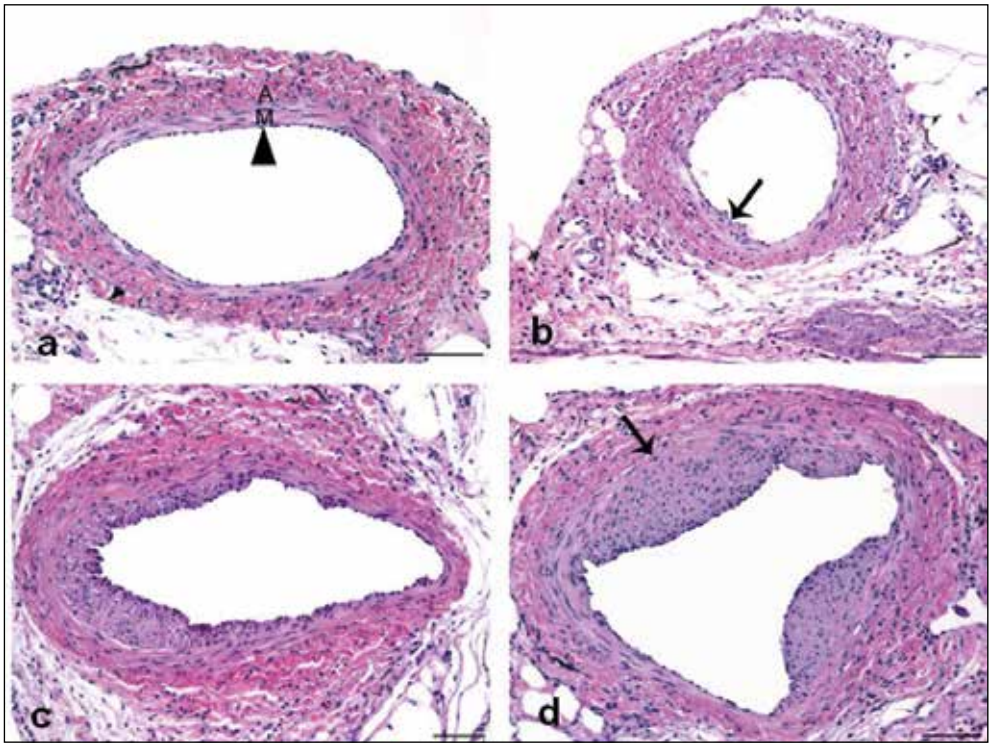


Figura 4. Quadri di proliferazione miointimale dell'arteria coronarica principale di salmone Atlantico (*Salmo salar* L.) con diversi gradi di gravità della lesione. (a) Arteria normale priva di proliferazione intimale, con un singolo strato di endotelio che poggia sulla lamina elastica interna (punta di freccia) (M: tunica media; A: tunica avventizia). (b) Singolo cluster di proliferazione miointimale costituito da un numero molto limitato di cellule (freccia). (c) Proliferazione miointimale che interessa circa il 50% della parete del vaso con concomitante frammentazione della lamina elastica interna. (d) La proliferazione miointimale occupa più del 50% della parete del vaso e si osserva una quasi completa deplezione della tonaca media (freccia) (barra=50 μm) (da: Dalum *et al*., 2016)

ca media. Colorazioni con Oil Red O su tessuto criopreservato non evidenziano la presenza di lipidi (Dalum *et al*., 2016). L'indagine immunoistochimica (IHC) permette di evidenziare una discreta positività per actina e smootelina nella media e nella neointima, con alcune differenze: mentre l'actina colora entrambe le strutture in modo uniforme, la smootelina colora in modo più intenso la porzione luminale della neointima, rivelando un netto gradiente verso la lesione. Sempre con l'IHC si rinvengono rare cellule T CD3+ (Dalum *et al*., 2016).

La lesione assomiglia allo stadio iniziale delle lesioni aterosclerotiche osservate nella specie umana, suggerendo un punto di partenza comune. Nell'arteriosclerosi della coronaria principale dei salmoni mancano il deposito di calcio e l'inclusione di lipidi, che costituiscono tipici riscontri delle lesioni mature dei mammiferi e ne determinano il successivo aggra-

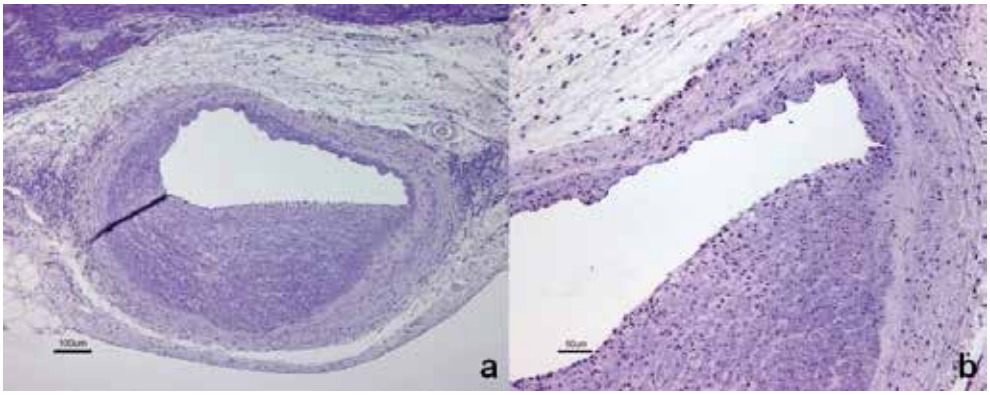


Fig. 5. Cuore di salmone dell'Atlantico allevato (*Salmo salar* L.). (a) Imponente proliferazione miointimale che determina l'occlusione parziale dell'arteria coronaria principale. (b) Maggior ingrandimento della figura precedente (colorazione Ematossilina-Eosina) (da Poppe *et al*., 2007)

vamento (Moore *et al*., 1976c; Mc-Kenzie *et al*., 1978; House e Benditt, 1981; Tabas *et al*., 2007; Koppang *et al*., 2007). Inoltre la lesione riscontrata nell'uomo è considerata una lesione infiammatoria e immunitaria cronica, dove è costante il rinvenimento di un infiltrato di macrofagi e linfociti T, che svolgono un ruolo importante nella progressione della lesione (Libby *et al*., 2011).

Nel salmone le lesioni sono state cercate in numerosi vasi arteriosi, ma rinvenute unicamente nel tratto dell'arteria coronaria principale che si appoggia al bulbo arterioso, con una forte prevalenza a livello della biforcazione del vaso (fig.3a,c). Sezioni istologiche seriali effettuate per tutta la lunghezza dell'arteria coronaria principale hanno evidenziato che l'arteria è compromessa dal 66% all'80% della sua estensione. Le lesioni di proliferazione intimale provocherebbero fenomeni occlusivi pari al 10-50% del lume vasale (Farrel *et al*., 1990a): non è però noto se queste lesioni possono danneggiare in modo serio l'apporto di sangue al cuore e provocare disfunzioni al pesce. Esiste solo una segnalazione nel salmone dell'Atlantico allevato (*Salmo salar* L.), in cui è stata osservata una mortalità pari al 10% dei soggetti durante il loro trasporto al macello avvenuto in condizioni di eccessiva densità dei pesci e bassa tensione dell'ossigeno disciolto nell'acqua. In tutti i soggetti sottoposti a necroscopia è stata descritta una proliferazione miointimale dell'arteria coronaria principale di forte entità (Fig.5) e la presenza di necrosi diffusa del tessuto ventricolare compatto, che gli autori correlano al deficit coronarico (Poppe et al., 2007).

Le lesioni iniziali dell'arteriosclerosi coronarica sono pressoché identiche nell'uomo e salmone; ma con il progredire della lesione, mentre nel salmone la proliferazione intimale rimane l'unica osservazione di rilievo, nella forma umana si assiste a un progressivo accumulo lipidico. Appare di estremo interesse la comprensione del meccanismo grazie al quale nell'arteriosclerosi del salmone la lesione si arresta, senza progredire in termini di accumulo lipidico: questo potrebbe essere di aiuto per limitare la progressione delle lesioni aterosclerotiche nell'uomo.

Patogenesi

Le prime ipotesi fatte per spiegare l'eziopatogenesi dell'arteriosclerosi della coronaria principale dei salmoni, hanno preso in considerazione le alterazioni legate alla senescenza degli individui (Robertson e Wexler, 1960; Robertson *et al*., 1961b). Questo dato sarebbe supportato dal fatto che più del 90% delle lesioni coronariche gravi verrebbe riscontrato nella popolazione di salmoni migratori in fase di ovodeposizione (Robertson *et al*., 1961a; van Citters e Watson, 1968). Tuttavia numerosi studi hanno dimostrato che in percentuale elevata anche i giovanili di salmone dell'Atlantico e del Pacifico presentano lesioni coronariche evidenti prima del raggiungimento della maturità sessuale (Moore *et al*., 1976c; McKenzie *et al*., 1978; House *et al*., 1979). Quindi il raggiungimento della maturità sessuale o lo stato di senescenza sembrano piuttosto fattori eziologici secondari. Alcune indagini dimostrano invece una correlazione positiva tra la taglia del pesce e la prevalenza della lesione, e questo vale sia per i salmoni selvatici che per quelli allevati (Farrel, 2002). Oltre che la taglia sembra essere importante anche il tasso di crescita, in quanto salmoni che presentano un tasso di crescita elevato sviluppano lesioni alla coronaria più gravi e più precoci. Inoltre è ormai accertato che la lesione alla coronaria principale progredisce con l'età (Farrel, 2002). Sembra quindi che la lesione coronarica sia correlabile all'età e alla crescita piuttosto che alla senescenza, e che il fattore d'innesco potrebbe essere un danno vascolare.

Nello sviluppo della lesione coronarica del salmone, si ritiene che la proliferazione intimale delle cellule MLV, rappresenti un cambiamento morfologico chiave (Dalum *et al*., 2016), tanto che l'inizio di una lesione sarebbe strettamente correlato alla proliferazione delle MLV e all'aumento dell'attività mitotica. Nell'uomo questo fenomeno è ugualmente descritto come uno degli eventi lesivi più precoci dell'aterosclerosi (Ross, 1984).

A differenza di altri tipi cellulari, le MLV non sono totalmente differenziate e possono presentare un sorprendente grado di plasticità, in risposta a stimoli esterni (Owens *et al*., 2004). Nell'uomo, in seguito a continue stimolazioni meccaniche lesive, le VSM assumono un fenotipo pro-infiammatorio, esprimono cioè molecole di adesione, che determinano il reclutamento leucocitario e secernono citochine pro-infiammatorie (Orr *et al*., 2010).

Al fine di simulare un danno meccanico vasale nella trota iridea (*O. mykiss*), sono state condotte indagini sperimentali nelle quali è stata provocata artificialmente un'abrasione meccanica lieve dell'arteria coronarica. I tessuti delle arterie di questi soggetti sono successivamente stati prelevati, posti in coltura e stimolati con timidina triziata, evidenziando un numero di mitosi nelle MLV significativamente più elevato rispetto ai controlli (Gong e Farrel, 1995). Per questo motivo è stato ritenuto che un danno vascolare intimale possa costituire un fattore scatenante l'arteriosclerosi coronarica dei salmoni, così come accade nella forma umana (Ross, 1984).

Sempre nell'uomo uno dei meccanismi di danno meccanico ritenuti importanti è costituito dall'ipertensione, che può provocare alterazioni all'endotelio e alla lamina elastica. Nel pesce quest'ultima condizione non può essere evocata in quanto la pressione arteriosa a livello delle coronarie è molto bassa. Nei salmonidi, però, l'arteria coronaria principale è adagiata sull'aorta ventrale ed è intimamente connessa con il bulbo arterioso, entrambi estremamente elastici. A causa dei forti movimenti contrattili del ventricolo e della conseguente attività depulsatoria del bulbo arterioso, quest'ultimo subisce ampie dilatazioni con forte stiramento della sua parete e di conseguenza dell'arteria coronaria. Questo comporta un'eccessiva deformazione dell'arteria coronaria, soprattutto nei periodi di forte attività fisica e di forte stress, quando il bulbo arterioso è eccessivamente disteso. E' stato così proposto che un eccesso di stiramento dell'arteria coronaria può causare un danno vascolare e questo evento può quindi determinare l'inizio della formazione della lesione (Saunders *et al*., 1992). Questo concetto

sarebbe stato suffragato da recenti indagini volte a studiare l'espressione di geni indotti dalla distensione tissutale, come la "cysteine-rich angiogenic inducer 61", in lesioni coronariche di salmone di diversa gravità. I risultati dimostrano una sovra-espressione di questi geni, che incrementa con la gravità della lesione (Dalum *et al*., 2016).

Questo spiegherebbe anche perché l'arteriosclerosi nel salmone è limitata all'arteria coronaria principale e raramente descritta in altri vasi. Tutti gli eventi stressanti che determinano un aumento della pressione arteriosa con aumento della distensione del bulbo arterioso possono costituire importanti fattori causali della lesione arteriosa.

E' opportuno altresì ricordare che altri fattori di tipo metabolico possono giocare un ruolo importante nella progressione della lesione. Sembra infatti che gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), costituiscano importanti regolatori delle mitosi delle cellule VSM nel salmone (Gong *et al*., 1997).

In prove sperimentali in cui basse dosi di Acido Arachidonico (AA), un acido grasso polinsaturo di tipo omega-6, venivano aggiunte nel terreno di coltura di cellule MLV di salmone, si osservava un aumento significativo della stimolazione mitotica, cinque volte maggiore rispetto a quella promossa dalla stimolazione meccanica. Diversamente i PUFA di tipo omega-3, come l'acido ecoisopentaenoico, hanno evidenziato un'azione di riduzione del numero delle mitosi, in quanto agirebbero come antagonisti dell'effetto esercitato dall'A.A. Il bilanciamento dell'effetto dell'azione mitogena e antimitogena sulle cellule MLV delle coronarie può essere influenzato dalla qualità della dieta (Farrel *et al*., 1986). Recenti prove sperimentali condotte in salmone hanno previsto la somministrazione di quattro diete sperimentali in cui l'olio di pesce, con il miglior rapporto omega-3/omega-6, usato nei controlli, è stato sostituito rispettivamente con olio di oliva, olio di colza e olio di soia. La ricerca non ha evidenziato differenze significative nello sviluppo delle lesioni, pertanto si può affermare che né la variazione del rapporto omega-3/omega-6, né alti livelli di acidi grassi omega-6 aumentano il rischio di sviluppo di lesioni coronariche in questa specie ittica (Dalum *et al*., 2016). A questo bisogna aggiungere un altro dato significativo: i salmoni sono fisiologicamente dislipidemici e ipercolesterolemici, con livelli di colesterolo totale anche 5 volte superiore a quello dei mammiferi (Babin e Vernier, 1989), senza però presentare i rischi di deposito ateromatoso che presenta il paziente umano con elevata colesterolemia. Ancora una volta la differenza di predisposizione tra uomo e salmone va cercata nelle caratteristiche della parete vasale e nelle lipoproteine sieriche. Tra i punti chiave dello sviluppo dell'aterosclerosi nei mammiferi troviamo la produzione di matrice extracellulare (MEC) modificata, da parte delle cellule MLV, che promuove la ritenzione e la modificazione di LDL (Tabas *et al*., 2007). La carica e le caratteristiche spaziali (caratteristiche chimico-fisiche) della MEC sono di grande importanza per la ritenzione dei lipidi all'interno della parete vasale, costituendo così un deposito ideale di molecole pro-aterogeniche (Doran *et al*., 2008). A quanto pare le caratteristiche chimico-fisiche della MEC di salmone sono tali da non favorire la ritenzione di LDL, prevenendo così l'accumulo di lipidi. Il confronto delle proprietà chimico-fisiche della MEC di salmone con quella umana potrebbe offrire una nuova comprensione del contributo della MEC nello sviluppo dell'aterosclerosi umana (Dalum *et al*., 2016). Inoltre, è opportuno ricordare che le HDL sono le lipoproteine predominanti nel sangue dei teleostei, deputate al trasporto della maggior parte del colesterolo plasmatico, in contrasto con l'uomo dove la maggior parte del colesterolo plasmatico è trasportato da LDL. La frazione di colesterolo trasportata da LDL ha una maggiore affinità per i proteoglicani della parete vasale, determinando così l'accumulo lipidico intimale (Flood *et al*., 2004). Invece alti livelli di HDL paragonati con LDL esercitano un'azione benefica con un effetto atero-protettivo (Tall, 2008). Da questo si evince che il salmone possa essere naturalmente resistente all'accumulo di lipidi a livello vascolare, nonostante la sua ipercolesterolemia fisiologica.

Conclusioni

Il meccanismo patogenetico che appare più probabile come causa di innesco dell'arteriosclerosi della coronaria principale dei salmoni consiste nel danno vascolare che risulta da una eccessiva distensione del bulbo arterioso (Farrel, 2002); questo spiegherebbe perché la lesione è tendenzialmente confinata all'arteria coronaria principale. La crescita e il tasso di crescita sembrano implicati nella progressione della lesione. Un più elevato tasso di crescita può determinare uno stile di vita più stressante, che a sua volta peggiora ed estende la lesione intimale. Acidi grassi polinsaturi del tipo omega-6, stimolando le mitosi delle VSM delle coronarie, possono essere implicati nella progressione della lesione, anche se modificazioni nella dieta non apportano significativi peggioramenti. La differenza sostanziale nell'uomo è che la lesione poi progredisce con grave accumulo lipidico e danno vasale. Nel salmone questo non accade e le differenze vanno ricercate nelle diverse caratteristiche chimico-fisiche della MEC di salmone, che non favoriscono la ritenzione di LDL, prevenendo così l'accumulo di lipidi, e nel fatto che le HDL sono le lipoproteine predominanti nel sangue dei teleostei, trasportando il colesterolo che in questo caso presenta bassa affinità per i proteoglicani, esercitando così un'azione benefica con un effetto atero-protettivo. Pertanto si può concludere che il salmone può avere una resistenza naturale allo sviluppo dell'aterosclerosi, per l'attitudine a metabolizzare in modo positivo i lipidi.

Bibliografia

- Babin P.J. & Vernier J.M. 1989. Plasma lipoproteins in fish. Journal of Lipid Research 30, 467–489.
- Bruno D.W.,. Noguera P. A & Poppe T.T. 2013. “A Colour Atlas of Salmonid Diseases” . Second Edition. Edited by Springer.
- Dalum D., Tangen R., Falk K., Hordvik I., Rosenlund G., Torstensen B. and Koppang E.O., 2016. Coronary changes in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L):characterization and impact of dietary fatty acid compositions. J. Fish Dis. 39, 41–54
- Doran A.C., Meller N. & McNamara C.A. 2008. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 28, 812- 819.
- Farrell, A.P., Saunders, R.L., Freeman, H.C., Mommsen, T.P., 1986. Arteriosclerosis in Atlantic salmon: effects of dietary cholesterol, salinity and maturation. Arteriosclerosis 6, 453–461.
- Farrell, A.P., Johansen, J.A., Saunders, R.L., 1990a. Coronary lesions in Pacific salmonids. J. Fish Dis. 13, 97–100.
- Farrell, A.P., Davie, P.S., Sparksman, R., 1992a. The absence of coronary arterial lesions in five species of elasmobranchs, *Raja nasuta*, *Squalus acanthias*, *Isurus oxyrinchus*, *Prionace glauca* and *Lamna nasus*. J. Fish Dis. 15, 537–540.
- Flood C., Gustafsson M., Pitas R.E., Arnaboldi L., Walzem R.L. & Bor_en J. 2004. Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24, 564–570.
- Gong, B., Farrell, A.P., 1995. A method of culturing coronary artery explants for measuring vascular smooth muscle proliferation in rainbow trout: The effect of vascular injury. Can. J. Zool. 73, 623–631.
- Gong, B., Townley, R., Farrell, A.P., 1997. Effects of polyunsaturated fatty acids and some of their metabolites on mitotic activity of vascular smooth explants from the coronary artery of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can. J. Zool. 75, 80–86.
- House, E.W., Benditt, E.P., 1981. The ultrastructure of spontaneous coronary arterial lesions in steelhead trout (*Salmogairdneri*). Am. J. Pathol. 104, 250–257.
- Koppang E.O., Fischer U., Satoh M. & Jirillo E. 2007. Inflammation in fish as seen from a morphological point of view with special reference to the vascular compartment. Current Pharmaceutical Design 13, 3649–3655.
- Libby P., Ridker P.M. & Hansson G. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature 473, 317–325.
- Maneche, H.C., Woodhouse, S.P., Elso, P.F., Klassen, G.A., 1972. Coronary arterial lesions in Atlantic salmon (Salmo salar). Exp. Mol. Pathol. 17, 274–280.
- McKenzie, J.E., House, E.W., McWilliam, J.G., Johnston,D.W., 1978. Coronary degeneration in sexually mature rainbow and steelhead trout, *Salmo gairdneri*. Arteriosclerosis 29, 431–437.
- Moore, J.F., Mayr, W., Hougie, C., 1976c. Ultrastructure of coronary arterial changes in spawning Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). J.Comp. Pathol. 86, 259–267.
- Orr A.W., Hastings N.E., Blackman B.R. & Wamhoff B.R. 2010. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. Journal of Vascular Research 47, 168–180.
- Owens G.K., Kumar M.S. & Wamhoff B.R. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. Physiological Reviews 84, 767–801.

- Poppe T.T., 2007. Histopathology Workshop, “Cardiac diseases in fish” , EAFP Meeting Grado.
- Poppe T. T., Taksdal T. and Bergtun P. H. 2007. Suspected myocardial necrosis in farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.): a field case. Journal of Fish Diseases. 30, 615–620
- Robertson, O.H., Wexler, B.C., 1960. Histological changes in the organs and tissues of senile castrated kokanee salmon: *Oncorynchus nerki kennerlyi*. Gen. Comp. Endocrinol. 2, 458–472.
- Robertson, O.H., Wexler, B.C., Miller, B.F., 1961a. Degenerative changes in the cardiovascular system of spawning Pacific salmon (*Oncorynchus tshawytscha*). Circ. Res. 9, 826–834.
- Robertson, O.H., Krupp, M.A., Thomas, S.F., Favour, C.B., Have, S., Wexler, B.C., 1961b. Hyperadrenocorticism in spawning migratory and non-migratory rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Comparison with Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*). Gen. Comp. Endocrinol. 1, 473–484.
- Ross, R., 1984. Atherosclerosis. J. Cardiovasc. Pharmacol. 6, 5714–5719.
- Santer, R.M., 1985. Morphology and innervation of the fish heart. Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. 89, 1–102
- Saunders R.L., Farrell A.P. & Knox D.E. 1992. Progression of coronary arterial lesions in Atlantic salmon (Salmo salar) as a function of growth rate. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49, 878–884.
- Tabas I., Williams K.J. & Bor_en J. 2007. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. Circulation 116, 1832–1844.
- Tall A.R. 2008. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. Journal of Internal Medicine 263, 256–273.
- Van Citters, R.L., Watson, N.W., 1968. Coronary disease in spawning steelhead trout Salmo gairdneri. Science 159, 105-109.
- Vastesaeger, M.M., Delcourt, R., Gillot, P.H., 1965. Spontaneous atherosclerosis in fishes and reptiles. In: Roberts,L.C., Straus, R. (Eds.), Comparative atherosclerosis. Hoeber, New York.

LE ESCRESCENZE DI LAMBL DEL CAVALLO: MODELLO DI STUDIO DELLE STESSE LESIONI NELL'UOMO

FRANCO GUARDA, BARTOLOMEO BIOLATTI,
FRINE ELEONORA SCAGLIONE, ENRICO BOLLO

Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino

Vilém Dušan Lambl, studente boemo della Facoltà di Medicina di Vienna, descrisse per primo nel 1856 nel 2% delle autopsie umane le escrescenze a carico delle valvole aortiche che presero il suo nome (fig. 1). Successivamente Magarey (1949) osservò le stesse proliferazioni anche sulla valvola mitrale.

Le suddette lesioni non si riscontrano nei bambini ma diventano più numerose in rapporto alla progressione dell'età. Le escrescenze sono presenti sulla superficie atriale delle valvole sia normali sia patologiche (Hudson, 1965) senza rilievi clinici collegati. Non sempre è facile osservarle macroscopicamente; per lo più è necessario l'aiuto di un microscopio stereoscopico oppure immergere le valvole in acqua per vedere i piccoli ondeggiamenti delle lamelle.

Dal punto di vista morfologico le escrescenze sono costituite da lamelle filiformi della lunghezza di 1-10 mm, costituite da tessuto connettivo e ricoperte da endotelio.

Magarey (1949) considerò tali alterazioni quale conseguenza dell'organizzazione della fibrina depositata sulla superficie atriale delle valvole. Altri autori invece interpretano la lesione come un'endocardite trombotica non batterica (Gross e Friedberg, 1936), altri ancora come hyalofibromi (Koechlin, 1908), oppure come fibromixomi (Simmonds, 1908).

Secondo Sinapius (1955) si tratta di piccoli trombi più o meno organizzati, talvolta contenenti fibre elastiche.

Grant, Wood e Jones (1928) le repertano sulla valvola mitrale umana nel 70% nei cuori normali, e Magarey (1949) nell'85% delle 250 autopsie effettuate. Secondo quest'ultimo autore raramente si ingrossano in tumori papillari di aspetto simile a quello degli anemoni di mare.

Le forme complesse delle escrescenze di Lambl sono le c.d. "giant Lambl's excrescences", risultanti dalla aggregazione delle lamelle di siti adiacenti che crescono in misura esagerata e che si possono trasformare in fibroelastomi (Shirani *et al*., 1997).

Infine, molto raramente possono provocare emboli in organi periferici (Fitzgerald *et al*., 1982; Nighoghossian *et al*., 1995).

Tuttavia l'esatto meccanismo istopatogenetico non è ancora ben conosciuto. Infatti è dubbio se intervengano processi infiammatori o depositi di fibrina oppure siano da ricondurre a stiramenti o lacerazioni delle valvole con deposizione di fibrina.

Riteniamo pertanto che siano molto utili gli studi di patologia comparata per porre in evidenza le analogie e le differenze tra le lesioni dell'uomo e quelle osservate negli animali, soprattutto al fine di identificare possibili meccanismi patogenetici dell'insorgenza e sviluppo di queste lesioni.

In patologia veterinaria sono state condotte ricerche sistematiche soltanto nel cavallo sulla presenza delle escrescenze di Lambl, mentre non sono da sottovalutare le stesse lesioni ritrovate occasionalmente nel Tonno (*Thunnus thynnus*), ancora in fase di studio presso il nostro Dipartimento.

Nelle altre specie animali non risultano segnalazioni di escrescenze di Lambl, a eccezione di un caso nel cane (fig. 2) e nel suino (Guarda, comunicazione personale).

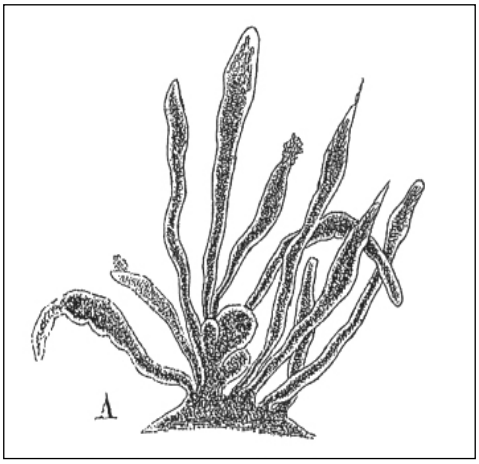


Fig. 1. Escrescenze di Lambl (disegno originale dell'autore).

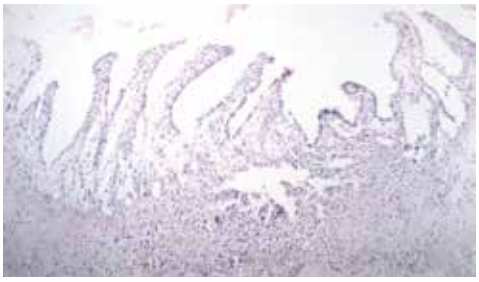


Fig. 2. Valvola mitrale di cane: presenza di escrescenze di Lambl (colorazione Ematossilina-Eosina; picc. ingr.)

Fig. 3. Valvola aortica di cavallo con escrescenze di Lambl sulla superficie atriale.

Fig. 4. Valvola mitrale di cavallo con escrescenze di Lambl.

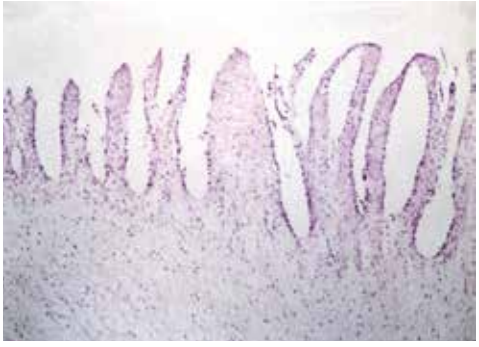


Fig. 5. Valvola mitrale di cavallo con la tipica struttura delle escrescenze di Lambl (colorazione Ematossilina-Eosina; medio ingr.).

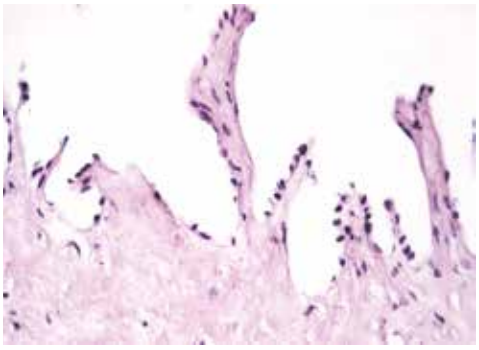


Fig. 6. Quadro istologico della struttura delle escrescenze di Lambl sulla valvola mitrale di cavallo (colorazione Ematossilina-Eosina; forte ingr.).

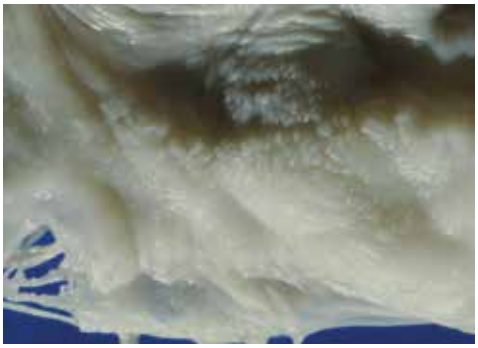


Fig. 7. Valvola mitrale di cavallo con escrescenze di Lambl su tessuto valvolare alterato.

Fig. 8. Valvola mitrale fibrosa di cavallo con escrescenze di Lambl sul bordo (colorazione Ematossilina-Eosina; picc. ingr.).

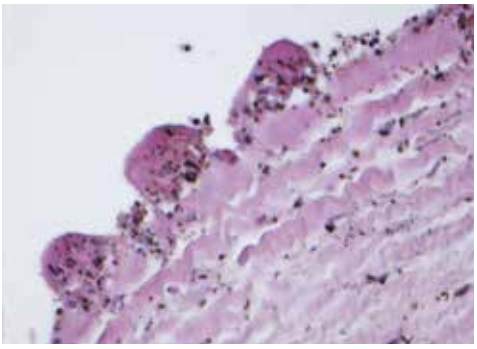


Fig. 9. Valvola bulbo-ventricolare di tonno con con presenza di trombi (colorazione Ematossilina-Eosina; picc. ingr.).

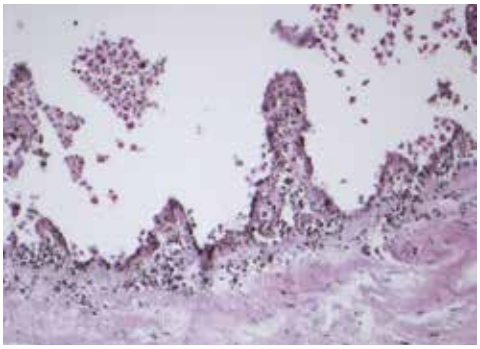


Fig. 10. Valvola bulbo-ventricolare di tonno con endocardite sub-intimale e presenza di lamella tissutale rivestita da cellule endoteliali (colorazione Ematossilina-Eosina; medio ingr.).

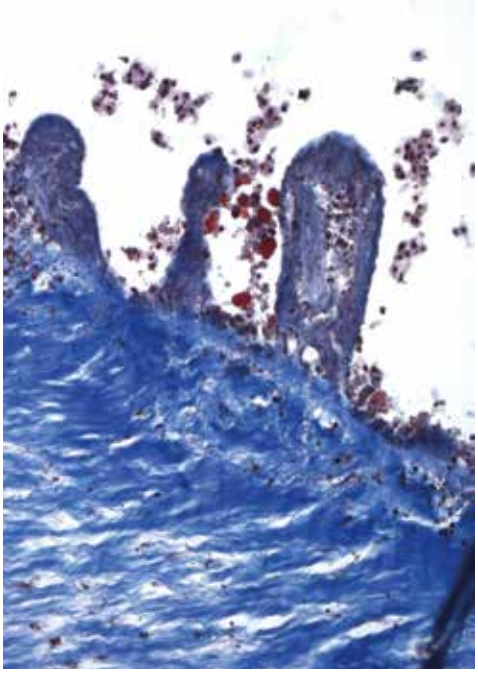


Fig. 11. Valvola bulbo-ventricolare di tonno con trombi e formazione di lamelle (colorazione Tricromica di Masson; medio ingr.)

Il cavallo, come risulta dalle descrizioni di Else e Holmes (1972a; 1972b) e di Guarda *et al*. (1997; 1999), è l'unica specie nella quale si osservano frequentemente le escrescenze di Lambl in soggetti oltre i 10 anni di età. Infatti in base alle nostre ricerche, se si considera la frequenza totale del 22,9% su 2387 autopsie di cavalli, dopo i 10 anni di età la percentuale sale al 75%. Analogamente Else e Holmes (1972) rilevarono in questa specie una percentuale di escrescenze di Lambl sulla valvola mitrale e sulle valvole aortiche del 24,5%.

Morfologicamente le proliferazioni si trovano sia sul bordo sia sulla superficie atriale delle valvole, talvolta singolarmente, talvolta raggruppate a forma di rosetta oppure a corona di rosario, formando una sottile rete di piccole lamelle più evidenti a luce incidente (figg. 3 e 4).

La loro struttura è costituita da fibrille connettivali con fibre elastiche e presenza di glicosaminoglicani positivi alla metacromasia con la colorazione al blu di toluidina. Le lamelle sono per lo più filiformi o piatte, rivestite da endotelio, anche se talvolta la forma è diversa con una base sottile che si allunga a fungo alla sommità (figg. 5 e 6).

Pertanto anche nei cavalli la morfologia è del tutto simile a quella riscontrata nell'uomo.

Nella nostra casistica le valvole cardiache che presentavano escrescenze manifestavano lesioni associate da senescenza, rappresentate da ispessimento della struttura, con piccole protuberanze e infossamenti, tipiche di pregressi processi infiammatori (figg. 7 e 8).

Pertanto, in base alle nostre osservazioni e a quelle di Else e Holmes (1972), le classiche lesioni delle escrescenze di Lambl nell'uomo e nel cavallo si equivalgono.

Altrettanto interessanti sono i reperti osservati sulle valvole bulbo-ventricolari dei Tonni (*Thunnus thynnus*) pescati nelle acque del mar Ligure.

In dieci pesci è stata rinvenuta a carico di queste valvole la presenza contemporanea di iniziali trombi valvolari che progressivamente si trasformano in trombi organizzati e quindi assumono la forma di lamelle di tipo connettivale rivestite da cellule endoteliali (Mignone *et al*., 2015; Garibaldi *et al*., 2015) (figg. 9-11).

In questi casi appare evidente la successione dei vari stadi patogenetici, per cui possiamo affermare che in tali soggetti le lamelle sono l'espressione della trasformazione di trombi valvolari in lamelle connettivali di Lambl, che rende l'istogenesi delle escrescenze di Lambl del tutto chiara.

Tuttavia non ci sembra azzardato trasferire questi risultati dal tonno alle altre specie animali e all'uomo, nonostante la distanza filogenetica di questa specie animale, anche se il numero di casi osservati è limitato.

Bibliografia

- Else R.W., Holmes J.R. (1972): Cardiac pathology in the horse. 1: Gross pathology. Equine Vet. J., 4:1.
- Else R.W., Holmes J.R. (1972): Cardiac pathology in the horse. 2: Microscopic pathology. Equine Vet. J., 4:57.
- Fitzgerald D., Gaffney P., Dervan P., Doyle C.T., Horgan J. Nelligan M. (1982): Giant Lambl's excrescence presenting as peripheral embolus. Chest, 81:516.
- Garibaldi F., Scaglione F.E., Bollo E., Mignone W., Guarda F. (2015): Endocarditis in blue Tuna (*Thunnus thynnus*) from the ligurian sea (western mediterranean). Proceedings of the Standing Commitee on Research and Statistic. Madrin (Spain), 28.9-2.10.2015. p. 197.
- Grant R.T., Wood J.E., Jones T.D. (1927-1929): Heart valve irregularities in relation to subacute bacterial endocarditis. Hearth, 14:247.
- Gross L., Friedberg C.K. (1936): Lesions of cardiac valves in rheumatic fever. Amer. J. Path., 12:855.
- Guarda F., Rattazzi C., Donn A., Gagna C. (1997): The Lambl's excrescences in the mitral valve of the horse. Eur. J. Vet. Path., 3:103.
- Guarda F., Giraldo A., Gagna C., Rattazzi C. (1999): Pathology of aortic and mitral valves in slaughtered horses. Eur. J. Vet. Path., 5:45.
- Koechlin E. (1908): Über primären Tumoren und papillomatöse Exkrescenzen der Herzklappen. Frankfurt. Z. Path., 2:295.
- Lambl V.D. (1856): Papilläre Exkrescenzen der semilunar Klappe der Aorta. Wien. Med. Wochenschr. 6:244.
- Magarey F. (1949): On the mode of formation of Lambl's excrescences and their relation to chronic thickening of the mitral valve. J. Path. Bact., 61:203.
- Nighoghossian N., Trouillas P., Perinetti M., Barthelet M., Ninet J., Loire R. (1995): Lambl's excrescence as an uncommon cause of cerebral embolism. Rev. Neurolog., 151:583.
- Shirani J., Bradlow J.A., Metveyeva P., Losada M., Factor S.M., Strom J.A., Sisto D. (1997): Transient loss of vision as the presenting symptom of papillary fibroelastoma of aortic valve – Two dimensional echiocardiographic recognition. Cardiovasc. Path., 6:237.
- Sinapius D. (1995) - Zur formalen Genese del Lamblschen Exkrescenzen. Virchow. Arch. Pathol. Anat., 326:387.

L'ENDOCARDIOSI: STATO DELL'ARTE NEI RIFLESSI DELLA PATOLOGIA COMPARATA E DELLA FILOGENESI

FRANCO GUARDA[1], BATTESIMO MACRÌ[2], LORIS GAY[3], FRINE ELEONORA SCAGLIONE[3]

[1] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; [2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina; [3] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Introduzione

Per endocardiosi si intende un processo degenerativo-distrofico delle valvole cardiache (Trautwein *et al.,* 1973) conosciuto in diverse specie tra le quali l'uomo, primati non umani, suini, cani, gatti, bovino e cavallo (Ayers e Jones, 1975). L'incidenza nel gatto, nel ratto, nei primati non umani, nel cinghiale, nel bovino e nel cavallo è bassa, di frequenza media nella volpe (Guarda e Macchi, 1994) e nello struzzo (Marengo *et al.,* 2008), mentre nel cane e nel suino è molto alta. Occasionalmente l'endocardiosi è stata osservata anche in altri animali domestici e selvatici, polli, faraone e pesci (Guarda *et al.,* 1993).

Al fine di allargare l'orizzonte della presenza e della frequenza nel maggior numero di specie animali sono in corso ricerche in altre specie animali quali tacchini, anitre, oche, tonno e pesce spada.

Per esempio, anche se i risultati non sono ancora definitivi, si può affermare che la frequenza dell'endocardiosi nei tacchini e nelle oche è molto alta, mentre nelle anitre è piuttosto bassa. La lesione distrofica delle valvole nei pesci è presente anche nei tonni, mentre nei pesci spada essa è presente anche se la frequenza non è stata definita con esattezza.

In passato la lesione era conosciuta negli animali con altre denominazioni, come fibrosi valvolare cronica, malattia cronica valvolare, mixoma valvolare, degenerazione mucinosa, degenerazione valvolare mixomatosa o mucoide (Guarda *et al.,* 1994).

Morfologicamente l'endocardiosi in tutte le specie studiate si estrinseca in una trasformazione mixomatosa della sostanza fondamentale della valvola e delle corde tendinee, caratterizzata da aumento dei glicosamminoglicani (GAG), acido ialuronico e condroitinsolforico.

Nei mammiferi e nell'uomo colpisce prevalentemente la mitrale e in minor misura la tricuspide e le semilunari.

La trasformazione mixomatosa della sostanza fondamentale determina un'atrofia della struttura del collagene di sostegno della valvola, con prolasso tanto più accentuato quanto più spiccata è l'atrofia del collagene stesso. L'aumento di volume dello strato spongioso condiziona l'aspetto macroscopico dei lembi valvolari che si presentano ridondanti, mammellonati e di consistenza ridotta.

Anatomo-patologicamente infatti si distinguono diversi stadi evolutivi a seconda della gravità:

- pochi e piccoli noduli edematosi, brillanti sui bordi con aree di opacamento della valvola;
- noduli più grossi di forma e volume diversi, di aspetto edematoso con bordi rotondeggianti;
- placche di aspetto calloso con distorsione, retrazione e ispessimento dei lembi.

Con il tempo i lembi subiscono un'iperdistensione, si assottigliano e assumono un'accentuata convessità. Altrettanto la perdita di elasticità delle corde tendinee le rende esposte alla rottura; gli spazi intertendinei dei lembi si estroflettono con un'iperdistensione, si assottigliano e assumono un'accentuata convessità.

Infine uno o più lembi valvolari protendono verso l'atrio sinistro, assumendo un aspetto

cupoliforme che li fa prolassare nella cavità atriale. Pertanto il prolasso della mitrale è un disturbo anatomico e funzionale che provoca la protrusione dei lembi mitrali al disopra del piano dell'anulus mitralico (Rizzon *et al.,* 1987).

Un analogo processo degenerativo mixomatoso può interessare anche le corde tendinee.

Tra le varie conseguenze e complicazioni si possono ricordare l'insufficienza atrio-ventricolare sinistra, la dilatazione dell'atrio sinistro, la presenza delle c.d. jet impact lesions, la rottura delle corde tendinee, la parziale rottura della parete dell'atrio sinistro (splitting).

Anche nell'uomo è nota l'endocardiosi, con il prolasso della mitrale, descritta per la prima volta dal cardiologo sudafricano Barlow (1963) mediante angiografia, e denominata per la prima volta come floppy valve syndrome da Read *et al*. (1965).

Anche nell'uomo la sindrome è conosciuta con svariate denominazioni, cioè con il nome di prolasso della mitrale, oppure systolic click murmur syndrome, redundant cusp syndrome, billowing mitral valve leaflet, Barlow-syndrome, floppy valve syndrome, oppure ancora come ballooning mitral valve syndrome.

La presenza di lesioni sovrapponibili tanto nell'uomo quanto nelle diverse specie animali ha rinnovato l'interesse per lo studio comparato dell'endocardiosi.

Per tale motivo riteniamo molto interessante studiare comparativamente l'endocardiosi nelle varie specie animali e nell'uomo, per porre l'accento sull'analogia morfologica, sulle eventuali differenze, sulle possibili complicazioni, sull'eziologia e sulla istopatogenesi, problemi non ancora del tutto risolti.

L'endocardiosi nell'uomo e nelle diverse specie animali

Nell'uomo la frequenza del prolasso della mitrale (figg. 1,2) ha un valore di circa il 10% nei giovani apparentemente sani (Gedda, 1987) e solo nel 20% ha un significato clinico (Remmele, 1999). Negli USA circa il 5% della popolazione è affetta da prolasso della mitrale (Schatz, 1988). Gli studi epidemiologici nell'uomo esprimono incidenze variabili tra lo 0,33 e il 17%, per cui la reale situazione non è ancora definita con certezza. Secondo Lucas ed Edwards (1983) l'incidenza e l'entità della degenerazione mixomatosa riscontrata nei reperti autoptici è la stessa per tutti i gruppi di età. Secondo tali autori questo fatto deporrebbe a favore di una origine congenita della lesione. Secondo Thiene (1988) il prolasso è la causa più frequente di insufficienza mitralica.

Sempre nell'uomo il prolasso della mitrale nella forma idiopatica è più frequente nel lem-

Fig. 1. Uomo: valvola mitrale con prolasso dei lembi.

Fig. 2. Uomo: endocardiosi di un lembo della valvola mitrale (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.).

bo posteriore (Sangiorgi *et al.,* 1987; Gallo, 1992) e non è correlato ad altre cardiopatie (Lucas e Edwards, 1983).

Numerosi autori hanno segnalato il frequente carattere familiare del prolasso della mitrale, con trasmissione di tipo autosomico dominante con prevalenza incompleta (Rizzon *et al.,* 1973; Barlow e Pocock, 1975; Procacci *et al.,* 1976; Biddison *et al.,* 1979; Jeresaty, 1979; Devereux *et al.,* 1982; Savage *et al.,* 1983).

Inoltre sono state rilevate 275 differenti mutazioni nei geni in corso di disordini del collagene di tipo I, II, III, IX e XI (Kuvaniemi *et al.,* 1997), tenendo presente che la maggior parte del collagene delle valvole è di tipo I e III e proprio in questi tipi di collageno sono stati repertati difetti nei pazienti umani (Basey *et al.,* 1978).

Brandt *et al.,* (1975) ritengono che nell'uomo i disturbi di sintesi, del contenuto o dell'organizzazione del collagene costituiscano l'inizio delle alterazioni mixoidi del prolasso valvolare.

Nell'uomo il prolasso mitralico è un rilievo comune nei pazienti con affezioni ereditarie del tessuto connettivo come la sindrome di Marfan, la sindrome di Ehlers-Danlos, l'osteogenesi imperfetta e alcune malformazioni cardiache (Rippe *et al.,* 1979). La sua precisa fisiopatologia resta però ancora da definire (Dean, 1986).

Sempre nell'uomo la sindrome del prolasso della valvola mitrale presenta una morfologia simile a quella del cane (Brandt *et al.,* 1975). Vi è la possibilità di morte improvvisa elettrica in bassa percentuale di casi in circa l'1,4% dei pazienti (Shapell *et al.,* 1973; Swartz *et al.,* 1977).

Nel cane l'endocardiosi è più frequente nei maschi rispetto alle femmine (con rapporto di 1,5-1) ed è importante in relazione all'età specialmente per gli animali di piccola taglia per una predisposizione di razza, essendo l'alterazione acquisita più comune in questa specie (Buchanan, 1999). In questa specie l'incidenza varia dal 17 al 40% (Kleene, 1991). Whitney (1974) la riscontrò nel 58% dei cani di 9 anni o più vecchi. Sono più colpite le valvole mitraliche, mentre raramente sono interessate le aortiche e polmonari. Nel 62% la mitrale è la sola colpita (figg. 3,4), la tricuspide (fig. 5) nel 10% dei casei, mentre nel 33% dei casi sono colpite entrambe (Buchanan, 1977).

Secondo Detweiler e Patterson (1965) e Das e Tashjian (1965) la degenerazione mixoide delle valvole atrio-ventricolari si aggira sul 75% delle lesioni cardiovascolari.

Nelle razze piccole di cani, per esempio nel Cavalier King Charles Spaniels, è stato supposto che l'endocardiosi sia ereditaria con una alterazione poligenica (Svenson *et al.,* 1996; Van Vleet e Ferrans, 2007).

Pomerance e Whitney (1970) hanno rilevato una frequenza sul 30% in soggetti dopo i 13 anni di età, mentre l'incidenza riscontrata da Luginbühl e Detweiler (1965) era dell'8%.

Come complicanze, si può avere la rottura delle corde tendinee (fig. 6), lo splitting dell'en-

Fig. 3. Cane: endocardiosi dei lembi delle valvole atrio-ventricolari.

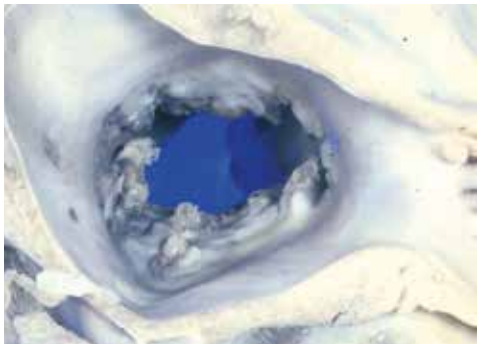


Fig. 4. Cane: prolasso dei lembi della valvola mitrale.

Fig. 5. Cane: prolasso del lembo settale della valvola tricuspide.

Fig. 6. Cane: rottura di una corda tendinea della valvola mitrale conseguente a endocardiosi.

docardio dell'atrio sinistro e le jet lesions per insufficienza cardiaca congestizia negli animali vecchi.

Per la maggior parte degli autori l'eziologia dell'endocardiosi nel cane è sconosciuta e la fisiopatologia è ancora da definire completamente, anche se sono stati portati contributi alla loro conoscenza. Aupperle *et al*., (2007) hanno osservato nell'endocardiosi canina un aumento dell'espressione della matrice metallo-proteinasi e dei suoi specifici inibitori tessutali in confronto alle valvole sane, fenomeno che potrebbe corrispondere a una diminuita degradazione della matrice extracellulare, risultando in un atipico accumulo di glicosamminoglicani.

Sperimentalmente in questa specie alcuni autori dimostrarono che lo stress (ACTH e cortisolo) potrebbe indurre lesioni valvolari simili morfologicamente all'endocardiosi (Schneider *et al*., 1972).

L'endocardiosi nel suino è stata studiata molto estesamente negli ultimi anni dalla Scuola di Veterinaria di Torino, dimostrando che questa specie animale è molto suscettibile a questa lesione.

Infatti nei suinetti neonati è stato riscontrato il 26,6% di endocardiosi, che aumenta al 37,5% negli animali a due mesi di età (fig. 7), anche se in questa specie sino a un mese di età l'architettura delle valvole non è ben definita in quanto i lembi valvolari sono costituiti da tessuto connettivale senza particolare orientamento strutturale. A un mese di età la struttura del lembo valvolare è riconoscibile nei suoi elementi fondamentali (Bernoco, 1959; Gobetto *et al*., 1979).

Ciononostante già a un giorno di età i soggetti colpiti da endocardiosi presentavano le clas-

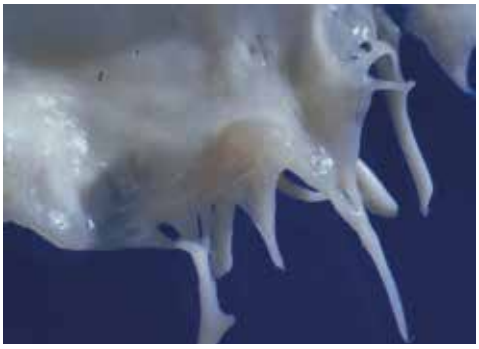


Fig. 7. Suino: iniziali lesioni da endocardiosi della valvola mitrale.

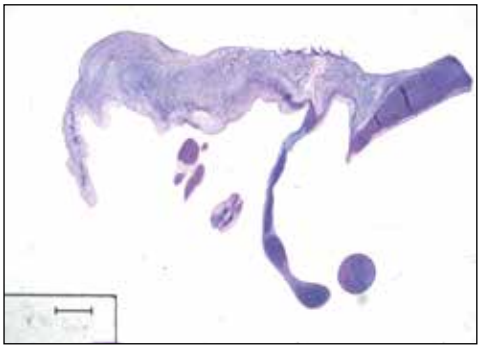


Fig. 8. Suino: soggetto di 2 mesi di età con endocardiosi (colorazione Alcian-Pas).

siche alterazioni caratterizzate da accumulo di mucopolisaccaridi nella sostanza fondamentale con aumento di volume, noduli di aspetto translucido (fig. 8) e con il margine libero leggermente convesso e simil-gelatinoso (Guarda *et al.,* 1992).

Nei suini di 9-10 mesi di età del peso di 120-130 kg regolarmente macellati, l'endocardiosi della mitrale presentava un'incidenza del 63,2% (fig. 9), mentre era del 17,7% a carico della tricuspide. Il prolasso della mitrale presentava un'incidenza dello 0,8% (fig. 10) associato alle jet impact lesions sulla superficie dell'atrio sinistro (fig. 11) (Guarda *et al.,* 1988; Negro e Guarda, 1989). Raro era il prolasso dei lembi della valvola semilunare polmonare (fig. 12).

Secondo Gagna *et al.,* (1998) in una ricerca eseguita in Svizzera su suini regolarmente macellati, l'endocardiosi era presente nel 29,5% dei casi, e gli autori esclusero l'influenza di fattori ambientali, mentre supposero che la proliferazione di capillari nelle valvole avrebbe potuto condizionare l'endocardiosi.

In altre ricerche su suini regolarmente macellati è stata rivelata una correlazione tra malformazioni cardiache ed endocardiosi alla mitrale; in particolare, la stenosi subaortica era associata all'endocardiosi delle valvole aortiche, mentre in generale nei cuori con malformazione l'endocardiosi era più grave rispetto ai suini senza malformazioni (Guarda *et al.,* 1993).

Il fenomeno è stato interpretato con una predisposizione di razza sia per le malformazioni sia per l'endocardiosi.

Altrettanto interessanti sono i risultati ottenuti nei suini a fine carriera, cioè a 4-5 anni di età, nei quali l'endocardiosi era associata a una malformazione cardiaca. In questi casi il processo distrofico delle valvole appariva molto più grave rispetto agli animali della stessa età senza malformazioni cardiache (Guarda *et al.,* 1993).

Sempre in questa specie animale sono state compiute indagini biochimiche sulle valvole normali e affette da endocardiosi. E' stato dimostrato che nelle valvole lese è aumentato l'acido sialico totale ed è presente un maggiore contenuto di sialoglicani e di galactosiltransferasi, ed è stato supposto che la glicosiltransferasi possa giocare un ruolo nella patogenesi dell'endocardiosi (D'Andrea *et al.,* 2001).

Infine in ulteriori ricerche biochimiche sempre nei suini è stato dimostrato che vi è un modello differente di N-glicosilazione nell'endocardiosi rispetto alle valvole normali, e che l'acido sialico mostra una prevalenza del legame alfa 2,6 mentre nelle valvole normali è più frequente il legame del tipo alfa 2,3 (Amoresano *et al.,* 2000).

Sempre nei suini, Castagnaro *et al.,* (1997) hanno osservato al microscopio elettronico una differenziazione dei miofibroblasti in fibroblasti in associazione all'incremento dei GAG e

Fig. 9. Suino: jet impact lesions sul tetto dell'atrio sinistro e sulla valvola mitrale.

Fig. 10. Suino: grave insufficienza della valvola atrio-ventricolare sinistra da endocardiosi.

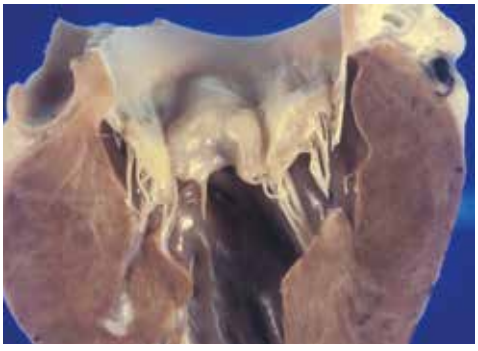


Fig. 11. Suino: prolasso della valvola mitrale per endocardiosi.

Fig. 12. Suino: prolasso di un lembo della valvola polmonare da endocardiosi.

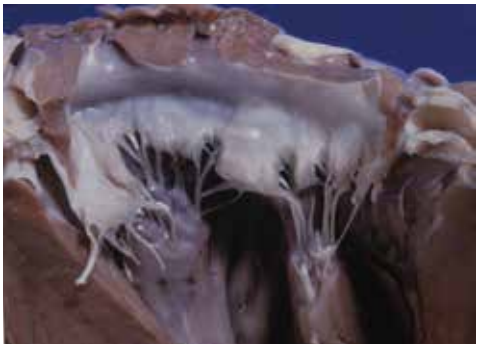


Fig. 13. Cinghiale: endocardiosi della valvola mitrale.

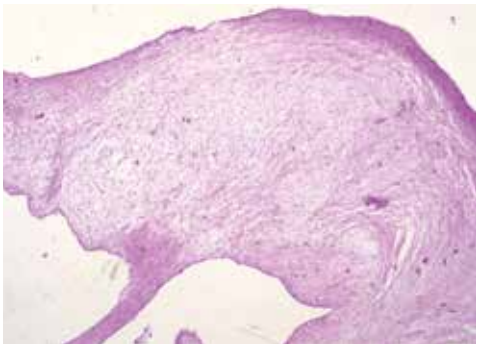


Fig. 14. Cinghiale: aspetto istopatologico dell'endocardiosi della valvola mitrale (colorazione Ematosilina-Eosina; piccolo ingr.)

Fig. 15. Cavallo: endocardiosi della valvola mitrale.

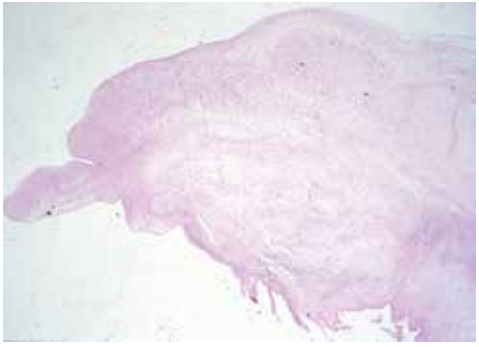


Fig. 16. Cavallo: aspetto istopatologico dell'endocardiosi della valvola mitrale (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.)

Fig. 17. Volpe: endocardiosi del lembo settale della valvola tricuspide.

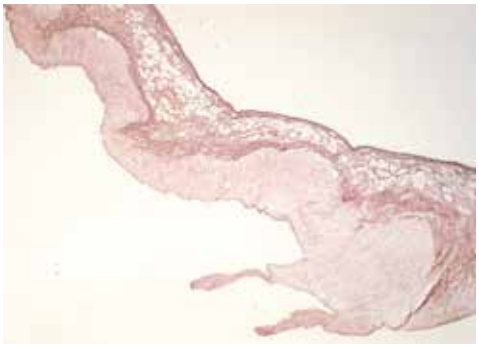


Fig. 18. Volpe: aspetto istopatologico dell'endocardiosi della valvola tricuspide (colorazione Weigert-Van Gieson, piccolo ingr.).

Fig. 19. Camoscio: prolasso della valvola mitrale.

Fig. 20. Camoscio: endocardiosi di una corda tendinea (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.).

Fig. 21. Struzzo: endocardiosi della valvola mitrale.

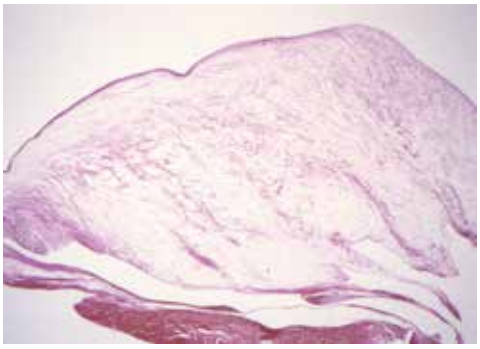


Fig. 22. Struzzo: aspetto istopatologico dell'endocardiosi della valvola mitrale (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.).

dell'acido ialuronico, fenomeni che potrebbero giocare un ruolo significativo nel meccanismo isto-patogenetico.

Infine Guarda *et al.,* (1994) hanno dimostrato che la base morfologica dell'endocardiosi era del tutto sovrapponibile sia nel cane, sia nel suino, sia nell'uomo.

Nei cinghiali vissuti allo stato libero, al contrario, l'endocardiosi è variabile dal 9,6 al 48,2% nella mitrale (figg. 13,14) e del 7,8% nella tricuspide, limitatamente ai gradini più lievi della lesione (Leoni *et al.,* 1993).

Nel cavallo l'endocardiosi è nota in tutte le età, ma è più frequente nei soggetti anziani (figg. 15,16) (Patteson, 1996).

Infine nelle volpi catturate nel Nord-Italia l'endocardiosi è stata riscontrata più frequentemente sul lembo settale della tricuspide (32%) (figg. 17,18) anziché nella mitrale. In un terzo dei casi studiati le alterazioni valvolari erano molto gravi (Guarda e Macchi, 1994).

Secondo Keene (1991) l'endocardiosi nei gatti è rara; e per Ayers e Jones (1978) l'incidenza nel gatto, nel ratto e nei primati non umani è bassa.

Secondo la nostra personale esperienza l'endocardiosi è presente in diverse altre specie di animali domestici e selvatici come per esempio nel camoscio (figg. 19,20), nello struzzo (figg.

Fig. 23. Pollo: endocardiosi della valvola mitrale.

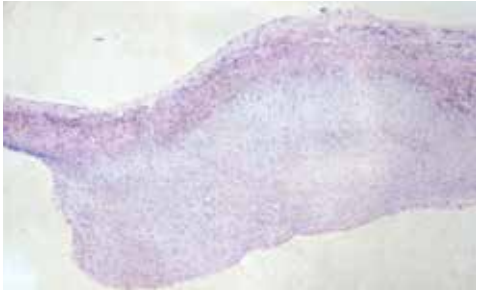


Fig. 24. Pollo: aspetto istopatologico dell'endocardiosi della valvola mitrale (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.).

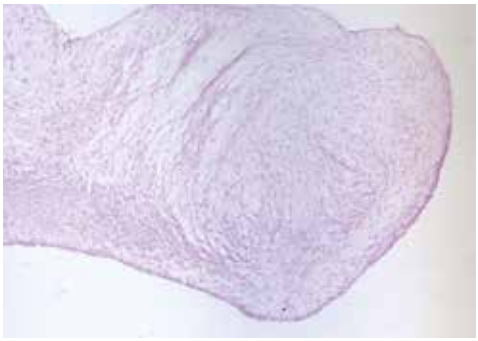


Fig. 25. Faraona: aspetto istopatologico dell'endocardiosi della valvola mitrale (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.).

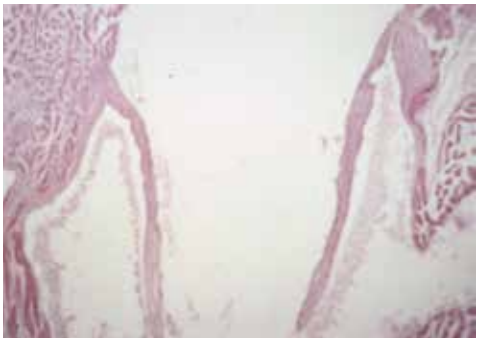


Fig. 26. Alalunga (*Tunnus alalunga*): aspetto istologico di valvola ventricolo-bulbare normale (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.).

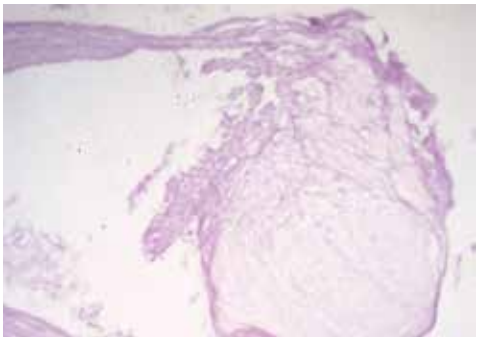


Fig. 27. Alalunga (*Tunnus alalunga*): aspetto istopatologico dell'endocardiosi della valvola ventricolo-bulbare (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingr.).

21,22) nel pollo (figg. 23,24), nella faraona (fig. 25) e in diverse specie di pesci (figg. 26-28) (Guarda *et al.,* 1991; Macrì *et al.,* 1988; Marengo *et al.,* 2008), anche se non si conoscono ancora né l'incidenza né la gravità, mentre la morfologia anatomica della lesione è sovrapponibile a quella nota nelle altre specie.

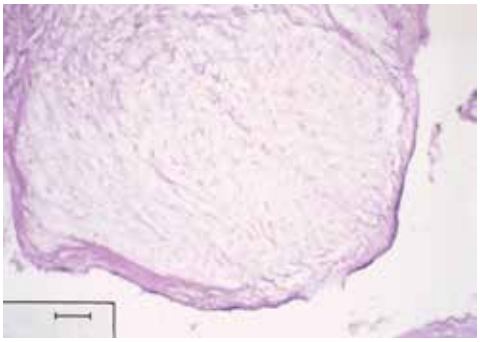


Fig. 28. Alalunga (*Tunnus alalunga*): particolare della figura precedente (colorazione Ematossilina-Eosina; forte ingr.).

Considerazioni e conclusioni

I problemi sollevati dall'endocardiosi, soprattutto dal punto di vista comparato, sono affascinanti e complessi offrendo numerosi spunti di discussione, poiché l'eziologia (per lo meno negli animali) non è ancora definitivamente accertata né tanto meno l'istopatogenesi.

Nell'uomo l'endocardiosi si trasmette come carattere autosomico dominante (Barlow e Pocock, 1975; Biddison *et al.,* 1979; Rizzon *et al.,* 1979; Devereux *et al.,* 1982; Gedda, 1987), mentre negli animali sembra avere un'origine poligenica (Van Fleet e Ferrans, 2007).

Buchanan (1977) suggerisce che la degenerazione del collagene sia influenzata geneticamente.

La diagnosi non presenta difficoltà quando la lesione è conclamata, anche se nelle fasi iniziali vi è una zona grigia tra la normalità e la lesione iniziale (Remmele, 1999).

Nel cane secondo Van Fleet e Ferrans (2007) i maschi di certe razze sono più frequentemente colpiti rispetto alle femmine, per altri autori l'eziologia è sconosciuta (Keene, 1991), per certe altre specie ancora vi sarebbe una predisposizione di razza (Guarda *et al.,* 1993).

Nel cane l'endocardiosi è la più comune causa d'insufficienza cardiaca congestizia (Trautwein *et al.,* 1973; Whitney, 1974; Buchanan, 1977; Kogure, 1980; Van Fleet e Ferrans, 2007) ed è importante in rapporto all'età media o avanzata specialmente nei soggetti di piccola taglia (Trautwein *et al.,* 1973).

Altrettanto avviene nei suini, nei quali è un'alterazione piuttosto comune (Negro e Guarda, 1989) già presente nella giovane età in bassa percentuale (Guarda *et al.,* 1992) per poi progredire progressivamente in rapporto all'età (Guarda *et al.,* 1992).

Sempre nel suino molto spesso l'endocardiosi è associata a malformazioni cardiache con la gravità delle alterazioni valvolari più accentuate.

Tali osservazioni possono indurre a prospettare alcune interpretazioni e cioè:

1. se si tratta di alterazioni poligeniche o da geni dominanti, esse indurrebbero sia le malformazioni sia l'endocardiosi;
2. l'endocardiosi potrebbe essere inquadrata nelle malattie d'accumulo, delle quali si conoscono diversi esempi sia nell'uomo sia negli animali, sempre di origine genetica;
3. le malformazioni cardiache provocano certamente correnti anomale nelle cavità cardiache, che potrebbero aggravare l'endocardiosi preesistente.

La maggiore incidenza dell'endocardiosi nei suini rispetto ai cinghiali può essere una conseguenza della selezione genetica spinta e degli incroci effettuati per ottenere una maggiore produzione di carne. Questo fatto può avvalorare la teoria della predisposizione genetica, così come l'associazione con le malformazioni cardiache.

Quello che è assolutamente accertato è l'uniformità morfologica della lesione tanto nell'uo-

mo quanto negli animali, soprattutto in cani, suini e uomo (Guarda *et al*., 1994). Un altro elemento che conferma questa tesi è la presenza di animali affetti da endocardiosi e ugualmente predisposti per altre malattie del collagene quali la malattia del disco intervertebrale, la rottura dei legamenti crociati e la malattia periodontale (Buchanan, 1977; Jaffe *et al*., 1981).

Purtroppo nella maggior parte delle altre specie animali, come nel cavallo, bovino, pollo, faraona, struzzo e diverse specie di pesci di mare, l'endocardiosi è poco conosciuta per la mancanza di ricerche sistematiche. Ciononostante si è autorizzati, in base alle osservazioni sporadiche effettuate, ad affermare che l'endocardiosi anche in queste specie è presente con lo stesso substrato morfologico, ma in maniera più lieve rispetto al cane e al suino.

Recentemente ricercatori della Scuola Veterinaria di Edimburgo hanno compiuto un passo avanti nella comprensione della patogenesi dell'endocardiosi del cane. Infatti Han *et al*. (2013), studiando le alterazioni delle cellule endoteliali e interstiziali nell'endocardiosi del cane, hanno rilevato una mancata degradazione delle cellule interstiziali sottostanti alla superficie valvolare, dimostrando un danno delle cellule endoteliali con attivazione dei mio fibroblasti, fenomeno che rappresenta un rimodellamento della valvola nel corso della vita.

Inoltre Liu *et al*. (2015), studiando culture cellulari endoteliali e interstiziali in vitro, dimostrano una eterogeneticità fenotipica che contribuisce a spiegare la biologia delle cellule della valvola del cane.

In conclusione sembra che lo sviluppo della lesione valvolare coinvolga alterazioni delle cellule interstiziali e il fenotipo delle cellule endoteliali. Molto recentemente è stata descritta l'endocardiosi valvolare e murale nello Zebrafisch anziano (Cooper e Spitsbergen, 2016)

Da un punto di vista generale si potrebbe proporre una teoria filogenetica sull'origine dell'endocardiosi, che è presente a seconda del progredire dell'evoluzione delle varie specie di vertebrati, sino a interessare in maniera progressiva l'uomo.

Questo non sarebbe l'unico esempio di alterazione conseguente alla filogenesi delle specie animali, come è già stato dimostrato per l'arteriosclerosi e per l'infarto cardiaco.

Il tessuto valvolare delle singole specie reagirebbe in maniera uniforme con differenze unicamente quantitative, condizionate in parte dal periodo naturale della vita e in parte dall'ambiente in cui vivono. Infatti come l'aggravamento della lesione evolve in rapporto con l'età (Detweiler e Patterson, 1965; Jones e Zook, 1965; Kogure, 1980) si può pensare analogamente che la lesione evolva secondo la filogenesi delle varie specie degli animali vertebrati.

Viene così confermato che l'ontogenesi è la ricapitolazione della filogenesi. In altre parole lo sviluppo dell'organismo ripercorre le tappe seguite dall'evoluzione della specie di appartenenza.

Ovviamente nel cane e nel suino, in cui vi è stata e continua ancora oggi una selezione molto spinta per assecondare le esigenze zootecniche, l'endocardiosi ha assunto aspetti molto gravi, con un'espressione genica per queste lesioni.

In conclusione, è prematuro trarre considerazioni definitive su tale interessante problema, poiché le nostre osservazioni interessano poche specie animali, ma possono essere un buon punto di partenza per allargare l'orizzonte sulle altre specie domestiche e selvatiche di cui si dispone di scarse conoscenze scientifiche.

A questo riguardo le difficoltà sono notevoli: basti pensare che sul pianeta Terra sono descritti finora 1,8 milioni di specie viventi tra vegetali e animali, e che tra queste esistono almeno un milione di specie animali tra le quali circa ottocentomila hanno almeno un abbozzo di apparato circolatorio (Cocrum e Mac Cauly, 1970) e quattrocentomila sono vertebrati (Scortecci, 1953).

Dobbiamo pertanto riconoscere, di fronte a una tale ricchezza di materiale, quanto sia molto più grande la nostra ignoranza in confronto alle nostre conoscenze acquisite.

Bibliografia

- Amoresano A., Amedeo S., D'Andrea G., Siciliano R., Gagna C., Castagnaro M., Torella C., Marino G. e Guarda F. (2000) – *N-linked glycans of proteins from mytral valves of normal pigs and pig affected by endocardiosis* – Eur. J. Bioch. 267, 1299
- Aupperle H., März I., Thielebein J., Schubert A., Kiefer B., Kappe A., Schoon H.A. (2007) – *The role of MMPs and TIMPs in cronic valve disease in dogs* – Eur. Soc. Vet. Path., Monaco, 52
- Ayers K.M. e Jone S.R. (1978) – *The cardiovascular system*. In M. Bernischke K., Garner F.M. e Jones T.C. – Pathology of laboratory animals vol.I, Springer, New York, 1978
- Barlow J.B. (1963) – *The significance of late systolic murmurs* – Am. Heart J. 63, 443
- Barlow T.B. e Pocock H.A. (1975) – *The problem of non ejection systolic clicks and associated mitralic systolic murmurs: emphasis on the billowing mitral leaflet syndrome* – An. Heart J. 90, 636
- Beretta Anguissola A. – *Trattato delle malattie cardiovascolari* – UTET, Torino, 1987
- Bernoco D. (1959) – *Caratteri morfologici e vascolarizzazione delle valvole cardiache atrio-ventricolari e semilunari* – Tesi, Torino
- Biddison J.H., Dembo D.H., Spalt H., Hayes M.G. e Ledoux C.W. (1979) – *Familiar occurrence of mitral valve prolapse in x-linked muscular dystrophy* – Circulation 59, 1299
- Brandt K.D., Summer R.D., Ryan T.J. (1975) – *Herniation of mitral leaflets in the Ehlers – Danlos syndrome*, Am. J. Cardiol., 36, 524
- Buchanan J.W. (1977) – *Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs* – Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 21, 75
- Buchanan J.W. (1999) – *in Fox Ph. R., Sisson D. e Moise N.S.*- Textbook of canine and feline cardiology, Saunders, Philadelphia, 1999
- Castagnaro M., Amedeo S., Bertolotto A., Manzardo E., Riccio A., Guarda F. (1997) – *Morphological and biochemical investigations of mitral valve endocardiosis in pigs* – Res. Vet. Sci. 62, 125
- Cocrum E.L. e Mac Cauly W.J. – *Zoologia* – Piccin, Padova, 1970
- Cooper T.K. e Spitsbergen, (2016) Veterinary Pathology 53, 504
- D'Andrea G., Di Ciccio L., D'Alessandro A.M., Oratore A., Amedeo S., Appino S., Amoresano A. e Guarda F. (2001) – *Glycoproteins Hypersialylation and a different distribution of both glycans and some glycosiltransferase activities are found in pig endocardiosis* – Europ. Journ. Vet. Path. 7, 3
- Das K.M. e Tashjian R.J. (1965) – *Chronic mitral valve disease in dogs* – Ann. N.Y. Acad. Sci. 127, 5
- Dean G.A. (1986) – *Prolasso della valvola mitralica* – Minuti Menarini 10, 5
- Detweiler D.K. e Patterson D.F. (1965) – *The prevalence and types of cardiovascular disease in dog* – Ann. N.Y. Acad. Sci. 127, 481
- Devereux R.B., Brown W.T., Kramer-Fox R. e Sachs I. (1982) – *Inheritance of mitral prolase valve: effect of age and of gene expression* – Ann. Intern. Med. 97, 826
- Gagna C., Meier D., Ru G., Pospischil A., Guarda F. (1998) – *Pathology of mitral valve in regularly slaughtered pigs: an abbatair survey on the occurrence of mixoid degeneration (endocardiosis), fibrosis and valvulitis* – Zentralbl. Vet. Med. A. 45, 383
- Gallo P. – *Cuore e pericardio* – in Ascenzi A. e Mottura G., Trattato di anatomia patologica, IV ed., UTET, Torino, 1992
- Gedda A.L. (1987) – *Genetica delle malattie cardiocircolatorie* - in Beretta Anguissola A. : Trattato delle malattie cardiovascolari, UTET, Torino, 1987
- Gobetto A., Benvenuti C., Galloni M., Guarda F., Tavormina V. e Ceccarelli V. (1979) – *Valvole semilunari aortiche di suino e bioprotesi valvolari nell'uomo* – Annali Fac. Med. Vet. Torino, 26, 50

– Guarda F., Negro M. e Amedeo S. (1988) – *Sulla patologia del prolasso della mitrale nel suino* – Schw. Arch. Tierhlk 130, 583
– Guarda F. e Negro M. (1989) – *Beitrag zu Pathomorphology der Endokardiose des Schweines* – DTW 96, 377
– Guarda F., Griglio B. e Negro (1991) – *Sulla patologia dell'insufficienza mitralica nel suino* – Selez. Vet. 32, 363
– Guarda F., Castagnaro M., Macrì B., Badino G. e Lodi E. (1991) – *La patologia cardiaca dei pesci di mare e d'acqua dolce nel monitoraggio dell'azione di fattori patogeni ambientali* – Atti Sisvet 45, 168
– Guarda F., Griglio B. e Negro M. (1992) – *Sull'endocardiosi dei suinetti di età inferiore ai due mesi* – Documenti Vet. 12, 75
– Guarda F., Griglio B., Negro M. e Amedeo S. (1992) – *Osservazioni preliminari sull'endocardiosi dei suini riproduttori a fine carriera* – Sel. Vet., 33, 899
– Guarda F., Griglio B., Rossignoli M. (1993) – *Malformazioni cardiache ed endocardiosi nel suino* – Documenti Vet. 10, 49
– Guarda F., Castagnaro M. e Macrì B. (1993) – *Osservazioni istopatologiche sulla patologia cardiaca dei pesci di mare* – Il Pesce 10, 63
– Guarda F., Griglio B. e Rossignoli M. (1993) - *Herzmissbildung und Endokardiose beim Schwein* – DTW 100, 421
– Guarda F. e Macchi E. (1994) – *Sulla patologia endocardica delle volpi* – Atti Patologia della selvaggina, Volterra, 1994, 173
– Guarda F., Griglio B., Amedeo S., Passarino G. e Mollo F. (1994) – *Patologia comparata dell'endocardiosi nel cane, nel suino e nell'uomo* - Documenti Vet. 12, 57
– Han R.I. e coll. (2013) Morphological changes to endothelial and interstitial cells and to the extra cellular matrix in canine myxomatous mitral valve disease (endocardiosis), The Veterinary Journal 197 (2013) 388-394
– Jaffe A.S., Geltman E.M. e Rodey G.E. (1981) – *Mitral valve prolapse: a consistent manifestation of type IV Ehlers Danlos sindrome* – Circulation 64, 121
– Jeresaty R.M. – *Mitral valve prolapse* – Raven Press, N.Y.,1979
– Jones T.C. e Zook B.C. (1965) – *Aging changes in the vascular system of animals* – Ann. N.Y. Acad. Sci. 127, 671
– Keene B.W. (1991) – *Malattia valvolare cronica* – in Fox Ph. R. cardiologia nel cane e nel gatto, SBM., Noceto, 1991
– Kogure K. (1980) – *Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog* – Jap. J. Vet. Sci. 42, 323
– Kuvaniemi M., Tromp G. e Prockop D.J. (1997) – *Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III and XI), fibril-associated collagen (type IX) and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bones, cartilage and blood vessels* – Human Mutat. 9, 300
– Leoni A., Nieddu A.M., Pirino S., Sanna E., Guarda F., Macchi E., Durio P., Mignone W., Durante G., Dini W., Perrone A. e Gianduglia S. (1993) – *Contributo allo studio della patologia cardiaca nei cinghiali* – Documenti Vet. 5, 49
– Liu M.M. e coll. (2015) Culture and characterisation of canine mitral valve interstizial and endothelial cells, The Veterinary Journal 204(2015) 32-39
– Lucas R.V. e Edwards J.E. (1983) – *Floppy mitral valve and ventricular septal defects: an anatomic study* – J.A.C.C. 1, 1337
– Luginbühl H. e Detweiler D.K. (1965) – *Cardiovascular lesions in dogs* – Ann. N.Y: Acad. Sci. 127, 1965
– Macrì B., Peirone B. e Guarda F. (1988) – *Contributo allo studio della patologia cardiaca in pesci di mare* – Atti Sisvet 42, 821
– Marengo S., Tursi M., Iussich S. e Guarda F. (2008) – *Contributo allo studio sulla*

patologia cardiaca nello struzzo – Argomenti Sivemp 4, 77
- Negro M. e Guarda F. (1989) – *Contributo allo studio della patologia endocardica in suini regolarmente macellati* – Selezione Vet. 30, 235
- Patteson M. – *Equine cardiology* – Blockwell Science, London, 1996
- Pomerance A. e Whitney J. C. (1970) – *Heart valve change common to man and dog: a comparative study* – Cardiovascular Res. 4, 61
- Procacci P.N., Sauran S.V., Schreiter S.L. e Brisson A.L. (1976) – *Prevalence of clinical mitral valve – in 1169 young women*, New Engl. J. Med. 214, 1086
- Read R.C., Thal A.P. e Wendy V.E. (1965) – *Symptomatic valvular myxomatons transformation (the floppy valve syndrome): a possible form fruste of Morgan syndrome* – Circulation 32, 897
- Remmele W. – *Pathologie* – Springer, N. York, 1999
- Rippe J.M., Sloss L.J., Angoff G. e Alpert J.S. (1979) – *Mitral valve prolapse in adults with congenital heart disease* – Am. Heart J. 97, 561
- Rizzon P., Antonelli G. e Chiddo A. (1987) – *Il prolasso della mitrale* – in Beretta Anguissola
- Rizzon P., Biasco G., Brindicci G. e Mauro F. (1973) – *Familiar sindrome of midsystolic click and late systolic murmur* – Brit. Heart J. 25, 245
- Rizzon P., Brindicci G. e Biasco G. (1979) – *Prolasso della mitrale: epidemiologia e criteri diagnostici* – Atti Congr. It. Cardiol. Bari
- Sangiorgi M., Cannata D. e Autore C. (1987) – *Vizi valvolari* – in Beretta Anguissola
- Savage D., Devereux R.B., Garrison R.J., Cartelli W.P., Anderson S.T., Levy D., Thomas H.E., Kannell W.B. e Feinleib M. (1983) – *Mitral valve prolapse in the general population* – Am. Heart J. 106, 577
- Schneider P.E., Ernst E., Trautwein G. (1972) – *Die Endokardiose der Atrioventrickular klappen des Hundes* – Vet. Med. A. 19, 809
- Schatz I.J. (1988) – *Prolasso della valvola mitrale: dubbi non risolti* – Minuti Menarini 12, n.2 – 5
- Scortecci G. – *Animali* – vol. I, Labor, Milano, 1953
- Shapell S.D., Marschall C.E., Brown R.E. e Bruce T.A. (1973) – *Sudden death and the familial occurrence of mid systolic click late systolic murmur* – Circulation 48, 1128
- Swartz M.H., Telchholz L.E. e Duono E. (1977) – *Mitral valve prolapse* – Am. J. Med. 62, 366
- Thiene G. – *Apparato cardiovascolare* – in Calì e Fiore Donati L., Anatomia Patologica, USES, Firenze, 1988
- Trautwein G., Brass W., Kersten U., Ernst E., Schneider P., Schulz L., Amtsberg G., Bispring W., Kirchhopf H. e Schole J. (1973) – *Untersuchungen zur Aetiologie und Pathogenese der Endokardiose und Endokarditis des Hundes* – DTW 80, 493
- Van Vleet J. F., e Ferrans V.J. (2007) – *Cardiovascular system* - in Mc Gavin M.D. e Zachary J.F. (2007) Pathologie Basis of Veterinary Disease IV Ed. Morby S. Louis
- Whitney J.C. (1974) – *Observations on effect of age on severity of heart valve lesions in the dog* – J. Small Anim. Pract. 15, 511

LA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA FELINA: UN VALIDO MODELLO ANIMALE SPONTANEO PER LO STUDIO DELLA MALATTIA NELL'UOMO

ILARIA BIASATO

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Numerosi studi in medicina veterinaria hanno evidenziato come alcune patologie cardiache osservate spontaneamente nei piccoli animali siano caratterizzate da un quadro clinico-patologico analogo a quello delle corrispondenti patologie dell'uomo. Esempi particolarmente incisivi in merito si identificano nella cardiomiopatia aritmogenica del ventricolo destro del gatto (Fox *et al*., 2000) e del Boxer (Basso *et al*., 2004), nella cardiomiopatia restrittiva non ipertrofica del gatto (Fox *et al*., 2014) e nella cardiomiopatia ipertrofica (CMI) del gatto (Fox *et al*., 1995). Tra le patologie ivi menzionate, la CMI felina costituisce un modello animale spontaneo particolarmente valido e riconosciuto per lo studio della medesima patologia nell'uomo, con la quale condivide molti aspetti clinici e patologici (Maron e Fox, 2015).

La CMI felina è una patologia miocardica idiopatica, caratterizzata da un aumento della massa cardiaca e da un ventricolo sinistro ipertrofico e non dilatato (Fox, 2003; Ferasin, 2009). In quanto idiopatica, la CMI si manifesta in assenza di altre patologie cardiache in grado di determinare un'ipertrofia del ventricolo sinistro, quali, ad esempio, l'ipertensione sistemica e l'ipertiroidismo (Fox, 2003). A differenza di quanto si verifica nel cane (Fox, 2003), la CMI rappresenta la principale patologia miocardica nel gatto (Ferasin, 2012; Migliorini *et al*., 2012), dal momento che include i quasi due terzi delle cardiomiopatie rilevate in questa specie (Ferasin, 2009). Precedenti studi retrospettivi in ambito clinico hanno, difatti, rilevato una prevalenza del 57,5% (Ferasin *et al*., 2003) e del 67,6% (Riesen *et al*., 2007). La CMI si manifesta, nella maggior parte dei casi, in un'età compresa tra i 4,8 e i 7 anni (Migliorini *et al*., 2012), sebbene sia stata descritta anche in soggetti di due mesi d'età (Fujii *et al*., 2001), e, più frequentemente, nel maschio (Liu *et a*l., 1975; Tilley et al., 1977; Liu e Tilley, 1980; Fox, 2003; Ferasin, 2012; Migliorini *et al*., 2012). Le razze feline nelle quali la malattia è maggiormente diffusa sono il Maine Coon, il Ragdoll, il Persiano, il British Shorthair, lo Sphinx e l'Himalayano (Migliorini *et al*., 2012), ma la CMI è spesso identificata anche nel Domestic Shorthair (Fox, 2003; Ferasin, 2009; Smith e Dukes-McEwan, 2012) e nello Chartreux (Treihou-Sechi *et al*., 2012). Sebbene una predisposizione familiare, indicativa di un'alterazione genetica sottostante, sia stata riportata in diverse razze feline considerate predisposte allo sviluppo della CMI, quali il British Shorthair, il Persiano, l'American Shorthair (Granström *et al*., 2011), il Burmese, il Norvegese delle foreste (Ferasin, 2009) e lo Sphynx (Silverman *et al*., 2012), una causa genetica è stata dimostrata solo nel Maine Coon e nel Ragdoll (Migliorini *et al*., 2012). Nel dettaglio, in un gruppo di gatti di razza Maine Coon è stata dimostrata una mutazione (A31P) del gene che codifica la sintesi della proteina C3 legante la miosina (MYBPC3), mentre nel Ragdoll è stata scoperta una seconda mutazione (R820W) dello stesso gene su un sito diverso rispetto a quello della razza Maine Coon (Migliorini *et al*., 2012). Tali alterazioni genetiche condizionano sia l'età d'insorgenza della patologia sia il tempo di sopravvivenza dell'animale, in quanto i soggetti Maine Coon e Ragdoll omozigoti manifestano la malattia, rispettivamente, entro i 4 e gli 1,5 anni d'età (Migliorini *et al*., 2012) e presentano un tempo di sopravvivenza significativamente più breve rispetto a quello delle altre razze (Treihou-Sechi *et al*., 2012). Uno studio ecocardiografico nel Maine Coon ha riportato

Figura 1. Gatto, cuore: marcata ipertrofia concentrica diffusa del ventricolo sinistro.

Figura 2. Gatto, cuore: marcata ipertrofia asimmetrica diffusa del ventricolo sinistro coinvolgente il setto interventricolare.

Figura 3. Gatto, cuore: moderata ipertrofia segmentale subaortica.

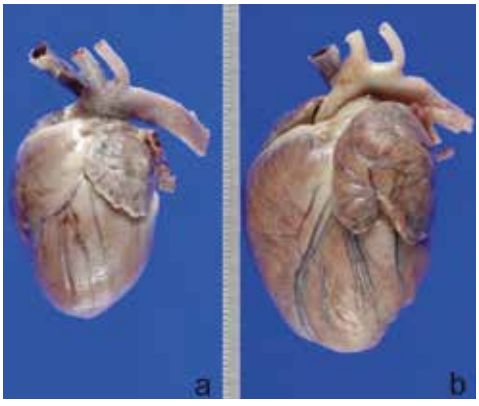


Figura 4. Gatto, cuore: moderata (a) e marcata (b) dilatazione dell'atrio e dell'orecchietta sinistra.

una prevalenza della CMI in una popolazione di soggetti asintomatici pari al 26,2 % (Gundler *et al*., 2008), a differenza del 15,5 % rilevato in una popolazione di gatti apparentemente sani appartenenti, in maggioranza, a razze miste (Paige *et al*., 2009).

Dal punto di vista anatomo-patologico, la CMI può presentare quattro diversi pattern: un'ipertrofia concentrica diffusa coinvolgente il setto interventricolare e la parete libera del ventricolo sinistro (fig. 1), un'ipertrofia asimmetrica diffusa coinvolgente il setto interventricolare o la parete libera del ventricolo sinistro (fig. 2), un'ipertrofia segmentale confinata a un singolo segmento ventricolare sinistro (fig. 3) e un'ipertrofia segmentale coinvolgente segmenti di ventricolo sinistro non contigui (Ferasin, 2009).

Le ipertrofie concentriche diffuse e le asimmetriche diffuse sono le più frequenti, mentre quelle segmentali sono meno comuni. Il lume ventricolare sinistro è, generalmente, ridotto e i muscoli papillari sono ipertrofici. L'atrio sinistro presenta una dilatazione da moderata (fig. 4a) a marcata (fig. 4b) e la parete atriale può essere ipertrofica, normale o assottigliata (Fox, 2003).

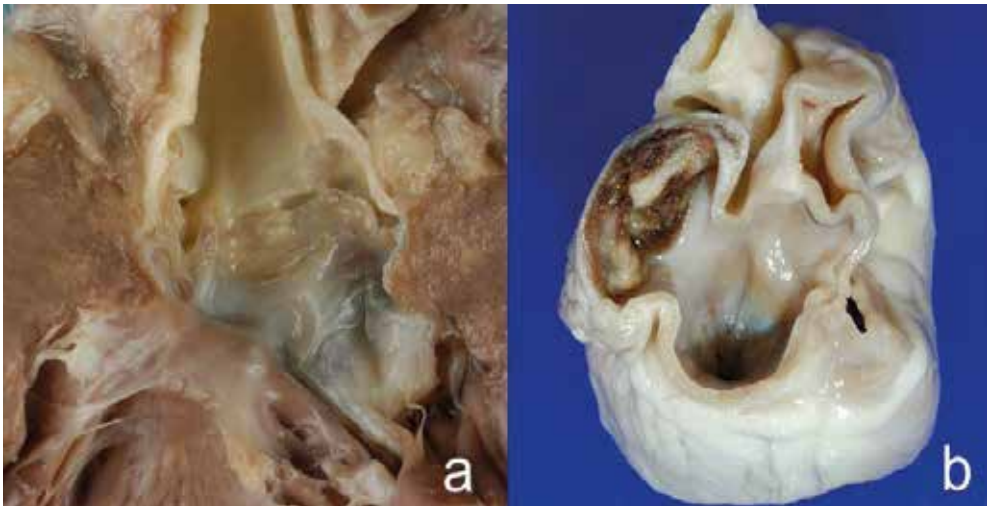


Figura 5. Gatto, cuore: fibrosi endocardica della via di efflusso del ventricolo sinistro (a) e trombosi dell'orecchietta sinistra (b).

Figura 6. Gatto, cuore: tromboembolismo aortico.

Frequentemente possono essere presenti un ingrandimento dell'atrio destro e un'ipertrofia del ventricolo destro ed è possibile identificare un assottigliamento aneurismatico dell'apice del ventricolo sinistro e focali infarti miocardici (Fox, 2003). Reperti macroscopici meno frequenti includono aree focali di fibrosi ventricolare, fibrosi endocardica della via di efflusso del ventricolo sinistro (Maxie e Robinson, 2007) (fig. 5a) e trombi nell'atrio (fig. 5b) e nel ventricolo sinistro (Fox, 2003; Maxie e Robinson, 2007). Nei gatti affetti è inoltre presente edema polmonare, in più del 50% dei casi, versamento pleurico, nel circa 20% dei casi (Fox, 2003) e tromboembolismo aortico (fig. 6) nel 7,7% (Riesen *et al*., 2007), 12% (Smith e Tobias, 2004), 13% (Smith e Tobias, 2004; Koyama *et al*., 2010), 17% (Koyama *et al*., 2010), 28%, 41% (Liu *et al*., 1981; Smith e Tobias, 2004), 48% (Bowles *et al*., 2010) o 51% dei casi

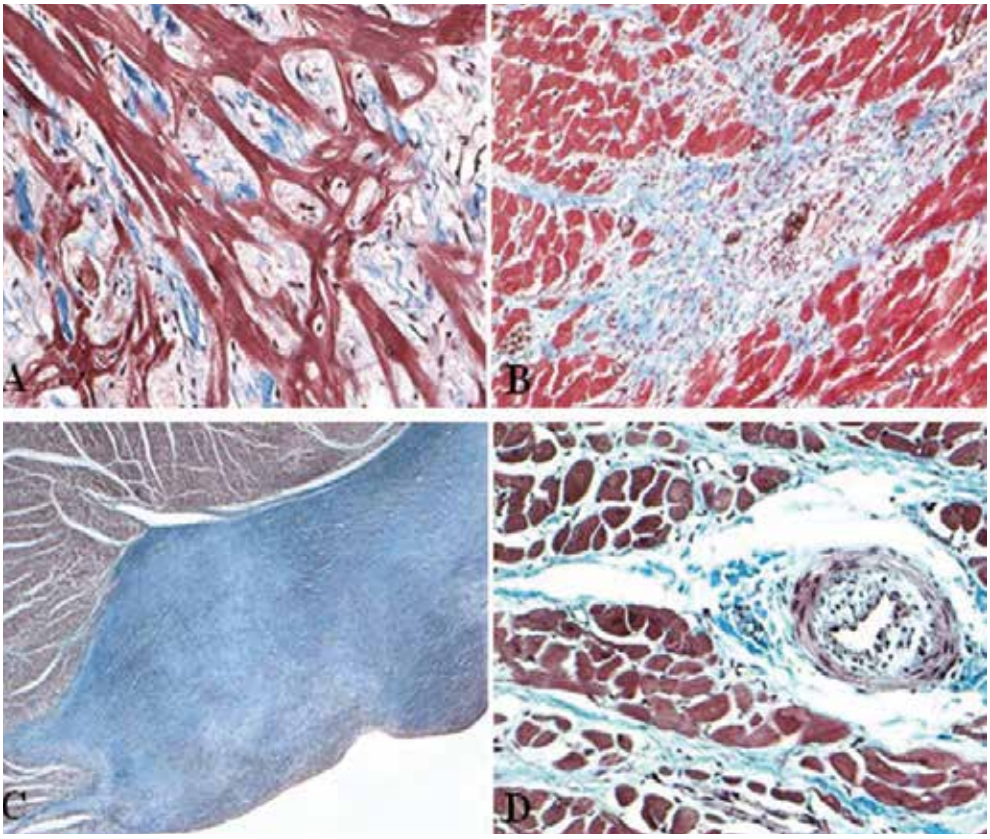


Figura 7. Gatto, cuore: caratteristiche istopatologiche della CMI. A) Disarray delle fibre miocardiche associato a fibrosi interstiziale (colorazione istochimica Tricromica di Masson) (20x). B) Fibrosi sostitutiva miocardica (colorazione istochimica Tricromica di Masson) (10x). C) Fibrosi endocardica (colorazione istochimica Tricromica di Masson) (2,5x). D) Patologia dei piccoli vasi (colorazione istochimica Tricromica di Masson) (20x).

(Liu e Tilley, 1980). Il tromboembolismo aortico, conseguente all'embolizzazione periferica di un trombo (formatosi generalmente a livello dell'orecchietta sinistra) e alla successiva riduzione del flusso arterioso ai tessuti situati distalmente all'occlusione, è difatti associato nella maggioranza dei casi alla CMI (Luis Fuentes, 2012), sebbene possa manifestarsi anche in altre forme di cardiomiopatia (Smith e Tobias, 2004; Luis Fuentes, 2012).

Dal punto di vista istopatologico, è caratteristico della CMI il disarray delle fibre miocardiche (fig. 7A) (Fox, 2003), ovvero la presenza di miocardiociti disposti perpendicolarmente od obliquamente gli uni rispetto agli altri (Liu e Tilley, 1980), con conseguente architettura tissutale bizzarra e disorganizzata (Fox, 2003). Il disarray è generalmente presente nel setto interventricolare e nella parete libera del ventricolo sinistro, ma può essere osservato anche nel ventricolo destro (Maxie e Robinson, 2007). I miocardiociti, inoltre, sono ipertrofici e possono presentare nuclei ovali e vescicolosi con nucleoli prominenti, nuclei grandi, cilindrici e scuri indicativi di poliploidia (Van Vleet *et al*., 1980) o nuclei ampi, rettangolari

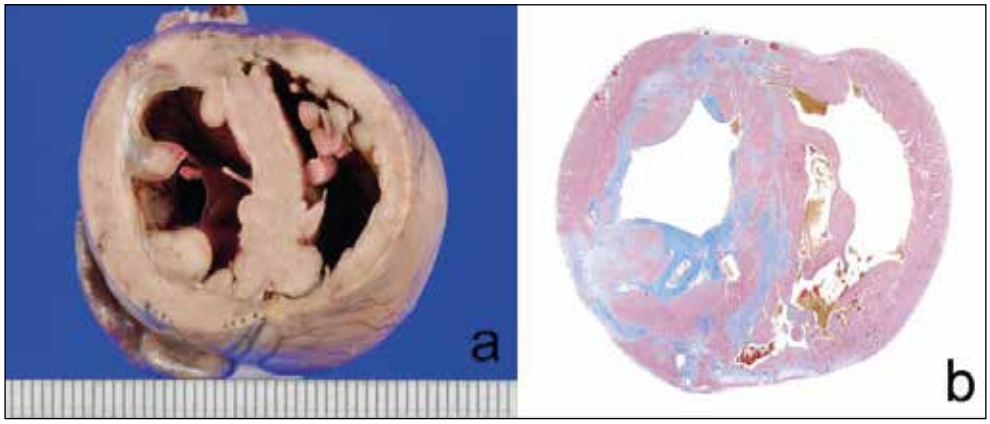


Figura 8. Gatto, cuore: cardiomiopatia ipertrofica in fase terminale (ES-HCM). Si rilevano pareti ventricolari sinistre relativamente assottigliate e un lume ventricolare sinistro marcatamente dilatato (a). All'esame istologico si identifica una grave e multifocale fibrosi miocardica sostitutiva associata a grave e focale fibrosi endocardica (colorazione istochimica Tricromica di Masson) (b).

e ipercromatici (Tilley *et al*., 1977; Liu e Tilley, 1980; Fox, 2003). Altri reperti istologici di frequente riscontro sono rappresentati dalla fibrosi miocardica (interstiziale o sostitutiva) e dall'arteriosclerosi delle arterie coronarie intramurali di piccolo calibro (patologia dei piccoli vasi) (Fox, 2003). Una fibrosi interstiziale diffusa (fig. 7A) è particolarmente evidente nei due terzi interni della parete libera del ventricolo sinistro, mentre sparse e focali aree di fibrosi sostitutiva (fig. 7B) sono rilevate in una minor percentuale di gatti. Possono essere inoltre presenti fibrosi endocardiche focali (Maxie e Robinson, 2007) (fig. 7C). Le arterie coronarie intramurali di piccolo calibro patologiche presentano un lume ridotto e un ispessimento della tonaca intima e media, conseguente all'aumento degli elementi del tessuto connettivo e, meno comunemente, alla proliferazione delle cellule muscolari lisce (Fox, 2003) (fig. 7D). Possono essere osservati inoltre sparsi infiltrati linfocitari e monocitari perivascolari (Maxie e Robinson, 2007) e occasionali miocardiociti degenerati, con vacuolizzazioni sarcoplasmatiche e lisi miofibrillare (Van Vleet *et al*., 1980).

In caso di insufficienza cardiaca sinistra cronica è, inoltre, possibile rilevare alterazioni vascolari polmonari compatibili con un quadro di ipertensione arteriosa, conseguente a ipertensione venosa cronica e caratterizzata da iperplasia della tonaca intima, ipertrofia della tonaca media, frammentazione e perdita della membrana elastica interna, fibrosi della tonaca avventizia e deposizione di collagene a livello della parete dei vasi arteriosi (Maxie e Robinson, 2007). Uno dei possibili esiti della CMI è rappresentato dalla forma terminale o *end stage* (ES-HCM) (Migliorini *et al*., 2012). Essa è caratterizzata da una relativa dilatazione del lume ventricolare, da un relativo assottigliamento delle pareti ventricolari (fig. 10), da un decremento della contrattilità cardiaca, da una marcata dilatazione atriale e da un'estesa fibrosi miocardica (Cesta *et al*., 2005) (fig. 11).

In associazione con la CMI, nel gatto possono essere presenti stenosi mitraliche acquisite, con deposizione di tessuto fibroso a livello dell'apparato valvolare mitralico causata dalla frizione meccanica sistolica tra le corde tendinee conseguente all'ipertrofia dei muscoli papillari (Takemura *et al*., 2003), e stenosi mitraliche sopravalvolari congenite (Campbell e Thomas, 2012).

La CMI felina è caratterizzata da un quadro fenotipico totalmente sovrapponibile a quello osservato nell'uomo. Si osservano, tuttavia, alcune differenze inter-specifiche sotto il profilo eziologico, clinico e terapeutico. Per quanto concerne l'eziologia, nell'uomo sono stati identificati circa 11 geni che codificano per la sintesi dei sarcomeri cardiaci responsabili di CMI, di cui sono note più di 1500 mutazioni. Nel gatto, al contrario, come già affermato in precedenza, le due sole mutazioni note sono state osservate nel Maine Coon e nel Ragdoll. Sul piano clinico, la morte improvvisa è più comune nell'uomo rispetto al gatto, in cui si osservano più frequentemente insufficienza cardiaca progressiva e tromboembolismo aortico. Nell'uomo inoltre si identificano più comunemente fibrillazioni e flutter atriali. Infine dal punto di vista terapeutico l'insufficienza cardiaca nell'uomo può essere trattata chirurgicamente mediante miectomia settale o, in caso di forme terminali, trapianto cardiaco. Nel gatto, al contrario, l'unica terapia attuabile è quella farmacologica (Maron e Fox, 2015).

In conclusione, considerate le profonde analogie tra gatto e uomo ivi descritte, lo studio della CMI felina potrebbe facilitare la comprensione dei meccanismi fisiopatologici che conducono all'insufficienza cardiaca e migliorare la gestione della malattia nell'uomo.

Bibliografia

- Basso C, Fox PR, Meurs KM, Towbin JA, Spier AW, Calabrese F, Maron BJ, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy causing sudden cardiac death in boxer dogs: a new animal model of human disease. *Circulation*. 2004 Mar 9;109(9):1180-5.
- Bowles D.B., Coleman M.G., Harvey C.J. Cardiogenic arterial thromboembolism causing non-ambulatory tetraparesis in a cat. *J Feline Med Surg*. 2010 Feb;12(2):144-50.
- Campbell F.E., Thomas W.P. Congenital supravalvular mitral stenosis in 14 cats. *J Vet Cardiol*. 2012 Mar;14(1):281-92.
- Cesta M.F., Baty C.J., Keene B.W., Smoak I.W., Malarkey D.E. Pathology of end-stage remodeling in a family of cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Vet Pathol*. 2005 Jul;42(4):458-67.
- Ferasin L. Feline cardiomyopathy. *In Practice*. 2012;34:204-213.
- Ferasin L., Sturgess C.P., Cannon M.J., Caney S.M., Gruffydd-Jones T.J., Wotton P.R. Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). *J Feline Med Surg*. 2003 Jun;5(3):151-9.
- Ferasin L. Feline myocardial disease. 1: Classification, pathophysiology and clinical presentation. *J Feline Med Surg*. 2009 Jan;11(1):3-13.
- Fox P.R. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical and pathologic correlates. *J Vet Cardiol*. 2003 Nov;5(2):39-45.
- Fox P.R., Basso C., Thiene G., Maron B.J. Spontaneously occurring restrictive nonhypertrophied cardiomyopathy in domestic cats: a new animal model of human disease. *Cardiovasc Pathol*. 2014 Jan-Feb;23(1):28-34.
- Fox P.R., Liu S.K., Maron B.J. Echocardiographic assessment of spontaneously occurring feline hypertrophic cardiomyopathy. An animal model of human disease. *Circulation*. 1995 Nov 1;92(9):2645-51.
- Fox P.R., Maron B.J., Basso C., Liu S.K., Thiene G. Spontaneously occurring arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in the domestic cat: A new animal model similar to the human disease. *Circulation*. 2000 Oct 10;102(15):1863-70.
- Fujii Y., Masuda Y., Takashima K., Ogasawara J., Machida N., Yamane Y., Chimura S., Awazu T., Yamane T., Wakao Y. Hypertrophic cardiomyopathy in two kittens. *J Vet Med Sci*. 2001 May;63(5):583-5.
- Granström S., Godiksen M.T., Christiansen M., Pipper C.B., Willesen J.L., Koch J. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a cohort of British Shorthair cats in Denmark. *J Vet Intern Med*. 2011 Jul-Aug;25(4):866-71.
- Gundler S., Tidholm A., Häggström J. Prevalence of myocardial hypertrophy in a population of asymptomatic Swedish Maine Coon cats. *Acta Vet Scand*. 2008 Jun 18;50:22.
- Koyama H., Matsumoto H., Fukushima R.U., Hirose H. Local intra-arterial administration of urokinase in the treatment of a feline distal aortic thromboembolism. *J Vet Med Sci*. 2010 Sep;72(9):1209-11.
- Liu S.K., Maron B.J., Tilley L.P. Feline hypertrophic cardiomyopathy: gross anatomic and quantitative histologic features. *Am J Pathol*. 1981 Mar;102(3):388-95.
- Liu S.K., Tilley L.P. Animal models of primary myocardial diseases. *Yale J Biol Med*. 1980 May-Jun;53(3):191-211.
- Liu S.K., Tilley L.P., Lord P.F. Feline cardiomyopathy. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1975;10:627-40.

- Luis Fuentes V. Arterial thromboembolism: risks, realities and a rational first-line approach. *J Feline Med Surg*. 2012 Jul;14(7):459-70.
- Maxie M.G., Robinson W.F. Cardiovascular system. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N.C. *Pathology of domestic animals*. Fifth edition. Philadelphia: M. Grant Maxie, Elsevier Saunders; 2007:1471-1575.
- Migliorini F. Miocardiopatie feline. In: Santilli R.A., Bussadori C., Borgarelli M. *Manuale di Cardiologia del Cane e del Gatto*. Prima edizione. Milano: Elsevier Masson Italia; 2012:205-224.
- Paige C.F., Abbott J.A., Elvinger F., Pyle R.L. Prevalence of cardiomyopathy in apparently healthy cats. *J Am Vet Med Assoc*. 2009 Jun 1;234(11):1398-403.
- Riesen S.C., Kovacevic A., Lombard C.W., Amberger C. Prevalence of heart disease in symptomatic cats: an overview from 1998 to 2005. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2007 Feb;149(2):65-71.
- Silverman S.J., Stern J.A., Meurs K.M. Hypertrophic cardiomyopathy in the Sphynx cat: a retrospective evaluation of clinical presentation and heritable etiology. *J Feline Med Surg*. 2012 Apr;14(4):246-9.
- Smith S., Dukes-McEwan J. Clinical signs and left atrial size in cats with cardiovascular disease in general practice. *J Small Anim Pract*. 2012 Jan;53(1):27-33.
- Smith S.A., Tobias A.H. Feline arterial thromboembolism: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2004 Sep;34(5):1245-71.
- Takemura N., Nakagawa K., Machida N., Washizu M., Amasaki H., Hirose H. Acquired mitral stenosis in a cat with hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Med Sci*. 2003 Nov;65(11):1265-7.
- Tilley L.P., Liu S.K., Gilbertson S.R., Wagner B.M., Lord P.F. Primary myocardial disease in the cat. A model for human cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 1977 Mar;86(3):493-522.
- Trehiou-Sechi E., Tissier R., Gouni V., Misbach C., Petit A.M., Balouka D., Sampedrano C.C., Castaignet M., Pouchelon J.L., Chetboul V. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). *J Vet Intern Med*. 2012 May-Jun;26(3):532-41.
- Van Vleet J.F., Ferrans V.J., Weirich W.E. Pathologic alterations in hypertrophic and congestive cardiomyopathy of cats. *Am J Vet Res*. 1980 Dec;41(12):2037-48.

I MODELLI ANIMALI PER LA DISTROFIA DI DUCHENNE

ELENA BIASIBETTI, ILARIA BIASATO, MARIA TERESA CAPUCCHIO

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Introduzione

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD), una tra le distrofie muscolari più diffuse, è una patologia genetica legata al cromosoma X dovuta a mutazioni eterogenee a carico del gene della distrofina (Moser, 1984; Moat *et al*., 2013). Clinicamente la DMD è caratterizzata da una progressiva debolezza fino alla perdita della capacita deambulatoria e da forti difficoltà respiratorie; la mortalità avviene generalmente fra la seconda e la terza decade di vita.

Il gene della distrofina, scoperto nel 1986 (Monaco *et al*., 1986; Kunkel, 2005), si localizza nel braccio corto del cromosoma X (Xp21), contiene 79 esoni e produce un trascritto primario full-lenght di 14,3 kb. Il gene della distrofina presenta almeno 7 diversi trascritti alternativi, dovuti a promotori diversi ed espressi in tessuti diversi. Oltre al trascritto tipico delle cellule muscolari scheletriche, è stato identificato ad esempio un trascritto più lungo, tipico delle cellule cerebrali, e uno, molto più corto, tipico delle cellule della retina.

La distrofina, descritta da Hoffman nel 1987, è una proteina del citoscheletro a forma bastoncellare, localizzata sul versante citoplasmatico della membrana plasmatica, con la funzione di mediare l'ancoraggio del citoscheletro di actina delle fibre muscolari striate alla membrana basale grazie a un complesso di glicoproteine di membrana associato alla distrofina (*dystrophin-associated glycoprotein complex*). Uno dei ruoli principali di questo complesso proteico è quello di stabilizzare il sarcolemma e proteggere le fibre muscolari dai danni a lungo termine indotti dalla contrazione (Michalak *et al*., 1997). La proteina è composta da 4 domini strutturali: un dominio N-terminale di 240 aminoacidi che contiene diversi siti di legame per l'actina responsabile delle interazioni tra la distrofina e il citoscheletro (Kunkel e Hoffman, 1989); un'ampia regione bastoncellare a tripla elica, formata da 24 ripetizioni di circa 109 aminoacidi ciascuna, disposte in tandem (Kunkel e Hoffman, 1989); un dominio ricco in cisteine di 280 aminoacidi (Blake *et al*., 2002); un dominio C-terminale di 420 aminoacidi, la cui struttura secondaria è un'α-elica avvolta a spirale (Blake *et al*., 1995).

La forma più frequente di mutazione del gene è la delezione di porzioni del gene più o meno estese. Di queste la maggior parte si localizza in due aree, una corrispondente ai primi 20 esoni del gene e l'altra intorno agli esoni 45-55 (Bladen *et al*., 2015); altre mutazioni riscontrate nei pazienti affetti da DMD sono mutazioni puntiformi ossia sostituzioni di singoli nucleotidi, delezioni e duplicazioni di uno o più nucleotidi che causano l'introduzione di codoni di STOP, la modificazione dei segnali di *splicing* o mutazioni a livello del promotore.

La variante allelica più lieve della DMD è la distrofia muscolare di Becker (BMD) causata da mutazioni nello stesso gene ma che mantengono la cornice di lettura (*in frame*) e portano alla produzione di una proteina quantitativamente ridotta o qualitativamente alterata. La BMD è una forma che si differenzia per l'esordio più tardivo e il decorso più benigno, anche se presenta una marcata variabilità nel quadro clinico e nella progressione della malattia.

Attualmente non esiste una cura. Una strategia terapeutica molto promettente è la terapia genica che potrebbe sostituire o riparare il gene difettoso.

Il gene distrofina è altamente conservato in vertebrati e invertebrati, e ad oggi troviamo ri-

portati in letteratura circa 60 diversi modelli animali per la DMD e la lista è in continua crescita (McGreevy *et al*., 2015; Yu *et al*., 2015). I modelli animali sono necessari per chiarire la patogenesi e per la valutazione dell'efficacia e della tossicità durante la sviluppo di terapie. Negli anni sono stati utilizzati diversi modelli mammiferi, spontanei o creati attraverso mutazioni genetiche, di DMD, tra cui topi, ratti, cani, gatti e maiali (Willmann *et al*., 2009; Nakamura e Takeda, 2011; Yu *et al*., 2015).

Il topo X-linked muscular dystrophy mouse (mdx), il cui gene della distrofina ha una singola mutazione puntiforme, è il modello animale più usato per la DMD. Il topo mdx è stato scoperto nei primi anni ottanta in una colonia di topi C57BL/10ScSn in cui sono stati riscontrati valori elevati di creatinina kinasi sierica e un'evidenza istologica di miopatia (Bulfield *et al*., 1984). Oltre al modello murino mdx, negli anni si sono aggiunti diversi ceppi: mdx2cv, mdx3cv, mdx4cv, mdx5cv, mdx52. I modelli murini forniscono risultati importanti sia per lo studio di base della patogenesi sia per lo sviluppo di terapie innovative; questi però non presentano il grave quadro clinico tipico dei pazienti affetti DMD, ma un quadro molto più lieve; questa differenza rappresenta il vero punto debole del modello murino (Nakamura e Takeda, 2011).

Per cercare di risolvere questo problema sono stati studiati soprattutto modelli canini e modelli di maiale con una mutazione nella regione hot spot del gene DMD umano (Yu *et al*., 2015). I risultati ottenuti da questi modelli animali potrebbero essere più affidabili e confrontabili con i pazienti umani; risulta quindi necessaria la completa comprensione delle loro caratteristiche per promuovere lo sviluppo di nuovi farmaci e approcci terapeutici.

Il cane

Diversi casi di cani affetti da distrofia muscolare (DM) sono stati segnalati nel corso degli ultimi 35 anni. La maggior parte di questi era dovuta probabilmente a una carenza di distrofina, ma solo nel 1992 Sharp *et al*. individuarono la mutazione a carico del gene della distrofina in un cucciolo di Golden Retriever. Il Golden Retriever diventa così uno dei primi modelli animale di DMD. Successivamente la carenza di distrofina e le mutazioni del gene vengono segnalate in diverse razze di cani (tab. 1) fra cui si riportano le mutazioni puntiformi trovate nel Cavalier King Charles Spaniel (introne 50) e nel Rottweiler (esone 52) (Sharp *et al*., 1992; Winand *et al*., 1994; Walmsley *et al*., 2010). Nonostante i numerosi lavori che segnalano la carenza di distrofina nei cani, la maggior parte degli studi è rappresentata da case reports.

Solo di alcune razze è stato possibile creare colonie sperimentali. La prima colonia sperimentale, quella maggiormente utilizzata, è di Golden Retriever con mutazione sull'introne 6 (Golden Retriever Muscular Dystrophy - GRMD, intron 6). Attualmente cani GRMD sono mantenuti in diverse colonie in tutti gli USA (tra cui l'Università del Missouri e la Texas A&M University), in Francia, in Brasile e in Australia (McGreevy *et al*., 2015). I cani GRMD sono stati incrociati con cani di razza Beagle da Shimatsu *et al*. (2003) presso il Centro nazionale di neurologia e psichiatria del Giappone per ottenere il modello "Canine X-linked muscular dystrophy in Japan" ($CXMD_J$).

I cani affetti da DM presentano un decorso clinico molto simile a quello dei pazienti affetti da DMD (tab. 2) (Valentine *et al*., 1988; Shimatsu *et al*., 2005; Smith *et al*., 2011).

Sono coinvolti tutti i muscoli, compreso il miocardio (cardiomiopatia), ma soprattutto i muscoli linguale, temporale, diaframma, sopraspinato, trapezio e sartorio. Alcuni muscoli, come il sartorio, sono gravemente compromessi alla nascita. I sintomi più comuni sono una debolezza degli arti e un'intolleranza all'esercizio fisico, già osservabile introno ai 2/3 mesi di età (analogamente a quanto accade nell'uomo a circa 3 anni) (Valentine *et al*., 1988). Inoltre si possono osservare atrofia muscolare, contratture, ipersalivazione, disfagia, disturbi della de-

	Topo	*Cane*	*Uomo*
Sintomi clinici			
Peso alla nascita	Normale	Normale	Normale
Aumento del peso corporeo	≥normale	<normale	<normale
Decorso clinico	Debole, non progressivo	Grave, progressivo	Grave, progressivo
Durata della vita	75% del normale	25% del normale	25% del normale
Morte neonatale	Rara	Circa il 25% degli animali affetti	Rara
Età dell'insorgenza dei primi sintomi	≥15 mesi	Dalla nascita ai 3 mesi	Dai 2 mesi ai 4 anni
Perdita deambulatoria	Rara	Infrequente	Comune all'inizio dell'adolescenza
Perdita muscolare	Minima a partire dai 15 mesi	Progressiva	Progressiva
Anomalie all' ECG	Frequenti	Frequenti	Frequenti
Cardiomiopatia	≥20 mesi; dilatativa (femmine) e ipertrofica (maschi)	Evidenziabile ecograficamente a partire dai 6 mesi	Evidente dai 16 anni
Difetti cognitivi	Deboli	Non vi sono informazioni	Un terzo delle persone colpite
Istopatologia			
Alterazioni presenti alla nascita	Minime	Minime	Minime
Necrosi acuta	Dalle 2 alle 6 settimane	Nessuna	Nessuna
Fibrosi	Minima negli adulti	Estesa e progressiva	Estesa e progressiva
Rigenerazione delle miofibre	Importante	Scarsa	Scarsa

Tab. 2. Comparazione dei sintomi clinici e istopatologici dovuti a carenza di distrofina in topo, cane e uomo (McGreevy *et al*., 2015).

ambulazione e segni di coinvolgimento cardiaco che, normalmente, diventano evidenti a partire dai 6 mesi (Valentine *et al*., 1988; Valentine *et al*., 1989; McGreevy *et al*., 2015). Intorno ai 6/10 mesi la malattia sembra stabilizzarsi (Shimatsu *et al*., 2005; Valentine *et al*.,1988); la morte si verifica frequentemente verso i 3 anni di età. Spesso essa è dovuta a una polmonite ab ingestis secondaria alla disfagia o a una insufficienza cardiaca progressiva. Gli esseri umani affetti da DMD presentano un quadro altamente eterogeneo dei sintomi clinici (McGreevy *et al*., 2015). Analogamente anche i cani mostrano sintomi variabili. In casi estremi si possono osservare soggetti affetti da DM ma con sintomi molto lievi (Zucconi *et al*., 2010). A livello biochimico entrambi, umani e cani, mostrano elevati valori di creatinina kinasi sierica (CK) da 10 a 20 volte più elevata alla nascita e da 500 a 1000 volte più elevata nel primo o secondo mese di vita (Shelton *et al*., 2005). Inoltre preentano valori superiori alla norma anche l'aspartato transaminasi (AST) e l'alanina aminotransferasi (ALT). L'elettromiografia con aghi concentrici rivela una significativa attività spontanea in forma di scarica pseudomiotonica: attività spontanea marcata sotto forma di potenziali continui e poi interrotti di colpo (potenziali pseudomiotonici), diversi da quelli tipici della miotonia (myotonic bursts), caratterizzati da un rumore progressivamente crescente e calante ("waxin and waning"). Il muscolo, inoltre, non risponde alla percussione.

Oltre alle analogie cliniche i cani presentano lesioni istologiche simili a quelle riportate in patologia umana.

Le lesioni caratteristiche riportate sono un marcato quadro di degenerazione/rigenerazione delle miofibre associato a una grave fibrosi. Nel *vasto lateralis* del Golden Retriever, già 15 giorni dopo la nascita, vengono riportate aree di estesa fibrosi e variazioni di diametro delle fibre muscolari (Paserini *et al*., 2002). In particolare le biopsie muscolari di cani affetti mostrano variazioni di dimensioni delle miofibre, fibre ipertrofiche e tondeggianti, necrosi, mineralizzazione, rigenerazione miofibrale, centralizzazione dei nuclei, sarcoplasma frequentemente ialino e ipereosinofilo e alcune volte vacuolizzato, aumento del tessuto connettivo e adiposo di endomisio e perimisio.

La capacità rigenerativa a livello muscolare risulta evidente soprattutto nei topi mdx dove si evidenzia un'alta percentuale di miofibre con nucleo in posizione centrale (caratteristica delle miofibre rigeneranti). La percentuale del numero di miofibre rigeneranti è invece minore sia negli umani con DMD sia nei cani (Smith *et al*., 2011; McGreevy *et al*., 2015). Attraverso indagini immunoistochimiche si evidenzia la mancanza di distrofina dalla membrana delle miofibre. A livello cardiaco alterazioni simili ai pazienti DMD sono riscontrabili attraverso l'elettrocardiogramma e l'ecocardiogramma a partire dai 6 mesi (Spurney, 2011). Istologicamente viene osservata la presenza di calcificazioni a livello ventricolare a partire dai 6 mesi e fibrosi a partire dai 12 mesi (Valentine *et al*., 1989).

Come sintetizzato in tab. 2, vi sono comunque delle differenze fra il cane e l'uomo. La morte neonatale, non presente nell'uomo, si verifica al contrario nel 20-30% circa dei cuccioli che muoiono entro 2 settimane dalla nascita, probabilmente a causa di un'insufficienza respiratoria per la diminuita funzionalità diaframmatica (Valentine *et al*., 1988; Shimatsu *et al*., 2005; Nakamura *et al*. 2013). I pazienti affetti da DMD, se non sono sottoposti a trattamenti, perdono la capacità deambulatoria durante i primi anni dell'adolescenza, mentre nei cani si mantiene la deambulazione nonostante la presenza di un'andatura rigida (Valentine *et al*., 1988).

Nel complesso, i cani CDMD condividono molte caratteristiche con quelle degli esseri umani con DMD. La presenza di queste caratteristiche come, per esempio, l'insufficienza respiratoria e l'insufficienza cardiaca (principali cause di morte per i pazienti DMD umani) rendono i cani CDMD un buon modello animale per studiare la DMD e valutare l'efficacia di nuove terapie. Inoltre sono modelli più grandi, con un maggior peso corporeo e una durata

Razze	*Mutazione*	*Note*
Alaskan Malamute	Non identificata	
Beagle	Mutazione puntiforme nell'introne 6 responsabile del processo di splicing	Non sono modelli spontanei
Bergamasco	Non identificata	Femmina affetta con CK elevata (12.336 IU/l)
Belgian Groenendaeler Shepherd	Non identificata	
Cavalier King Charles Spaniel	Mutazione puntiforme nell'introne 50 responsabile del processo di splicing	Exon skipping testato con Eteplirsen nelle cellule muscolari scheletriche in coltura
Cocker Spaniel	Delezione di 4 nucleotidi nell'esone 65	
German Short-haired Pointer	Mutazione per delezione dell'intero gene della distrofina che include la regione 3' UTR	
Golden Retriever	Mutazione puntiforme sull'introne 6 responsabile del processo di splicing	Il GRMD è ampiamente caratterizzato e impiegato in studi preclinici per varie applicazioni terapeutiche
Grand Basset Griffon Vendéen	Non identificata	
Irish Terriers	Non identificata	
Japanese Spitz	Interruzione della sequenza a livello dell'introne 19 del gene della distrofina	
Labrador Retriever	Inserzione di sequenze ripetute nell'introne 19	
Labrador Retriever	Non identificata	Espressione della distrofina ridotta come BMD
Lurcher Sibling	Non identificata	
Norfolk Terrier	Non identificata	
Old English Sheepdog	Non identificata	
Pembroke Welsh Corgi	Inserzione di sequenze lunghe intervallate nell'introne 13	Incrocio con razza Beagle per l'ottenimento di una colonia
Rat Terrier	Non identificata	Diminuzione livello di proteina distrofina
Rottweiler	Mutazione puntiforme non sense nell'esone 58	
Tibetan Terrier	Delezione esone 8-29	
Meticci	Non identificata	Femmina affetta con un alto livello di CK (45.000 UI/l) e nessuna espressione di distrofina
Weimaraner	Non identificata	

Tab. 1. Razze canine in cui è stata riscontrata una carenza di distrofina e mutazione associata (Yu *et al*. 2015)

della vita più lunga rispetto al modello murino, più idonei per l'utilizzo in studi tossicologici di terapie da applicare all'umana. Nel complesso i modelli canini permettono una più accurata comparazione con i sintomi umani rispetto ai modelli murini. Tuttavia i topi mdx rimangono il modello più comunemente usato in studi di terapia genica per la DMD a causa del basso costo ed il facile accesso.

Il gatto

La distrofia muscolare felina, caratterizzata dalla mutazione del gene della distrofina, viene anche chiamata "Hypertrophic Feline Muscolar Dystrophy" (HFMD) ed è molto rara. Si instaura in gatti maschi nei primissimi (3-6) mesi di vita. Gli animali colpiti mostrano ipertrofia muscolare generalizzata, evidente soprattutto nelle zone del collo, del tronco e della lingua, di cui si può avere protrusione parziale. L'elettromiografia con ago concentrico rivela un'attività spontanea marcata e sostenuta come nel cane distrofico. Le concentrazioni di CK, AST e ALT sono elevate. Oltre alla rigidità muscolare si ha un coinvolgimento cardiaco con necrosi multifocali, mineralizzazione, fibrosi e/o cardiomiopatia dilatativa. Tuttavia l'esame tramite elettrocardiogramma non ha mostrato le anomalie evidenti osservate comunemente negli esseri umani e negli altri modelli animali (Yu *et al*., 2015).

All'esame macroscopico si possono osservare una diffusa ipertrofia muscolare e multifocali aree pallide. I reperti istologici delle biopsie muscolari comprendono la degenerazione/rigenerazione della fibra muscolare, fibre splitting, mineralizzazione e centralizzazione dei nuclei, ipertofia delle miofibre e una minima/moderata fibrosi endomisiale. L'analisi immunoistochimica conferma l'assenza di distrofina (Shelton e Engvall, 2005).

Una caratteristica della HFMD è la possibile comparsa di un'iperacuta e letale rabdomiolisi con grave iperkaliemia durante l'anestesia con isofluorano, un anestetico per inalazione (Gaschen *et al*., 1998). La radbdomiolisi è stata segnalata come complicanza operatoria anche in pazienti affetti da DMD e BMD. Si potrebbe utilizzare il modello felino proprio per studiare misure preventive nei confronti di questa complicanza.

Per altri studi comparativi, il modello felino ha bisogno di ulteriori analisi per ottenere una maggiore comprensione delle mutazioni e dei fenotipi presenti (Yu *et al*., 2015).

Bibliografia

- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. Physiol. Rev. 82, 291-329, 2002 .
- Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, Dawkins H, Lamont L, Roy AJ, Chamova T, Guergueltcheva V, Chan S,Korngut L, Campbell C, Dai Y, Wang J, Barisic N, Brabec P, Lahdetie J, Walter MC, Schreiber-Katz O, Karcagi V, Garami M, Viswanathan V, Bayat F, Buccella F, Kimura E, Koeks Z, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakowska A, Kostera-Pruszczyk A, Zimowski J,Santos R, Neagu E, Artemieva S, Rasic VM, Vojinovic D, Posada M, Bloetzer C, Jeannet PY, Joncourt F, Diaz-Manera J, Gallardo E, Karaduman AA, Topaloglu H, Sherif RE, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay HL, Bellgard MI, Kirschner J, Flanigan KM, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Aartsma-Rus A, Beroud C, Lochmuller H. The TREAT-NMD DMD Global database: Analysis of More Than 7000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. Hum. Mutat. 36, 395-402, 2015.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1189-1192, 1984.
- Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ. et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. Nature 334, 154-156, 1988.
- Gaschen F, Gaschen L, Seiler G, Welle M, Jaunin VB, Jmaa DG, Neiger-Aeschbacher G, Adé-Damilano M. Lethal peracute rhabdomyolysis associated with stress and general anesthesia in three dystrophin-deficient cats. Vet. Pathol. 35, 117-123, 1998.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51, 919-928, 1987
- Hoffman EP, Gorospe JRM. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophsiological consequences of dystrophin deficiency. Curr. Top. Membr. 38, 113-154, 1991.
- Kunkel LM, Hoffman EP. Duchenne/Becker muscular dystrophy: a short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. Br. Med. Bull. 45, 630-43, 1989.
- Kunkel LM. 2004 William Allan award address. cloning of the DMD gene. Am. J. Hum. Genet. 76, 205-214, 2005.
- Moat SJ, Bradley DM, Salmon R, Clarke A, Hartley L. Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). Eur J Hum Genet. 21, 1049-53, 2013.
- Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323, 646-650, 1986.
- Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. Hum Genet. 66, 17-40, 1984.
- McGavin MD, Valentine BA, 2001, Muscle. In Thomsons special veterinary pathology, McGavin MD, Carlton WW, Zachary F, pgg 461-478, Saint Louis (Missouri): ed. Mosby.
- McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. Dis. Model. Mech. 8, 195-213, 2015.
- Nakamura A, Kobayashi M, Kuraoka M, Yuasa K, Yugeta N, Okada T, Takeda S. Initial pulmonary respiration causes massive diaphragm damage and hyper-CKemia in Duchenne muscular dystrophy dog. Sci. Rep. 3, 2183, 2013.
- Nakamura A, Takeda S. Mammalian modelsof Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. J. Biomed. Biotechnol. 2011: 184393, 2011.
- Passerini L, Bernasconi P, Baggi F, Confalonieri P, Cozzi F, Cornelio F, Mantegazza R. Fi-

brogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with X-linked golden retriever muscular dystrophy. Neuromuscul. Disord. 12, 828-835, 2002.
– Sarli G, Della Salda L, Marcato PS. Dystrophy-like myopathy in a foal. Vet Rec. 135:156-60, 1994.
– Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, et al. An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. Genomics 13,115–2,1992.
– Shelton GD, Engvall E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. Neuromuscul. Disord. 15,127–38, 2005.
– Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JN, Nonaka I and Takeda S. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). Exp. Anim. 52, 93-97, 2003.
– Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, Takeda S. Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. Acta Myol. 24, 145-154, 2005.
– Smith BF, Yue Y, Woods PR, Kornegay JN, Shin JH, Williams RR, Duan D. An intronic LINE-1 element insertion in the dystrophin gene aborts dystrophin expression and results in Duchenne-like muscular dystrophy in the corgi breed. Lab. Invest. 91, 216-23, 2011.
– Spurney CF. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. Muscle Nerve 44, 8-19, 2011.
– Willmann R, Possekel S, Dubach-Powell J, Meier T, Ruegg MA. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul. Disord. 19, 241-249, 2009.
– Yu X, Bao B, Echigoya Y, Yokota T. Dystrophin-deficient large animal models: translational research and exon skipping. Am. J. Transl. Res. 7, 1314-1331, 2015.
– Kornegay JN, Tuler SM, Miller DM, Levesque DC. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. Muscle Nerve 11, 1056-1064, 1988.
– Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, deLahunta A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. Acta Neuropathol. 71, 301-310, 1986.
– Valentine BA, Cooper BJ, de Lahunta A, O'Quinn R, Blue JT. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. J. Neurol. Sci. 88, 69-81, 1988.
– Valentine BA, Cummings JF and Cooper BJ. Development of Duchenne-type cardiomyopathy.Morphologic studies in a canine model. Am. J. Pathol. 135, 671-678, 1989.
– Winand NJ, Pradhan D, Cooper BJ. Molecular characterization of severe Duchenne-type muscular dystrophy in a family of Rottweiler dogs. In Molecular Mechanism of Neuromuscular Disease. Tucson, AZ: Muscular Dystrophy Association. 1994.
– Walmsley GL, Arechavala-Gomeza V, Fernandez- Fuente M, Burke MM, Nagel N, Holder A, Stanley R, Chandler K, Marks SL, Muntoni F, Shelton GD, Piercy RJ. A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin- deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping. PLoS One 5: e8647, 2010.
– Zucconi E, Valadares MC, Vieira NM, Bueno CR, Jr Secco M. Jazedje T, da Silva HC, Vainzof M, Zatz M. Ringo: discordance between the molecular and clinical manifestation in a golden retriever muscular dystrophy dog. Neuromuscul. Disord. 20, 64-70, 2010.

LA MIELOPATIA DEGENERATIVA DEL CANE QUALE MODELLO SPONTANEO DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA) DELL'UOMO

MARIA TERESA CAPUCCHIO[1], ELENA BASIBETTI[1], ILARIA BIASATO[1], MARIA TERESA GIORDANA[2]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino;
[2] Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Torino

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa dell'uomo caratterizzata dalla progressiva degenerazione e scomparsa dei motoneuroni con conseguente atrofia dei muscoli e paralisi dei movimenti, che conduce a morte per insufficienza respiratoria. Tra le malattie del motoneurone la SLA è una forma piuttosto frequente che colpisce individui di età superiore a 30 anni, di entrambi i sessi, con maggiore frequenza dopo i 50 anni. L'andamento della malattia è inarrestabile e non vi sono al momento terapie risolutive.

Le cause della SLA sono ignote e gli eventi sottesi alla morte dei motoneuroni rimangono imprecisati (Pasinelli e Brown, 2006). Circa il 10% dei casi di SLA sono familiari (Gros-Louis *et al*., 2006), mentre la maggior parte dei casi è sporadica.

Da oltre 20 anni sono state osservate mutazioni (oltre 160) del gene che codifica per la superossido dismutasi (SOD1) associate alla forma familiare con accumulo di questo enzima mutato in sede intracitoplasmatica neuronale e pertanto possibile danno tossico (Rosen *et al*., 1993; Abel *et al*., 2013). Sono inoltre state osservate nel 10% dei casi familiari mutazioni del gene *TARDBP* e circa nel 5% dei casi mutazioni del gene *FUS/TLS*. È stato inoltre recentemente riportato che un'espansione esanucleotidica all'interno del gene *C9ORF72* (localizzato sul cromosoma 9) è la causa di circa il 39% dei casi familiari e di circa il 7% dei casi sporadici (Majounie *et al*., 2012; Morgan e Orrell, 2016). L'opinione più diffusa è che i fattori genetici possano giocare un ruolo importante nello sviluppo della malattia, anche se probabilmente il meccanismo di danno patogenetico è multifattoriale, conseguente a una interazione tra substrati genetici e fattori ambientali (Morgan e Orrell, 2016).

Dal punto di vista clinico circa il 75% delle persone presenta inizialmente sintomi a un arto (tendenza a inciampare spesso, disturbi di deambulazione o difficoltà a eseguire compiti semplici che richiedono l'uso dell'arto); la restante parte mostra difficoltà nell'articolare parole e frasi (disartria), o presenta disfonia. In genere comunque si assiste a una progressiva e irreversibile perdita della capacità di deglutizione (disfagia), dell'articolazione della parola (disartria) e del controllo dei muscoli scheletrici, con una paralisi che può avere un'estensione variabile, fino ad arrivare alla compromissione dei muscoli respiratori e quindi alla necessità di ventilazione assistita, a cui fa seguito la morte entro 3-5 anni dall'esordio.

La neuropatologia della SLA si caratterizza per la perdita di motoneuroni nelle corna anteriori del midollo spinale e nei nuclei motori dei nervi cranici, sclerosi e demielinizzazione dei cordoni antero-laterali per interessamento del fascio cortico-spinale (fig. 1B) e perdita di motoneuroni nella corteccia motoria (Leigh *et al*., 1991).

L'aspetto patologico tipico nella SLA è la presenza di inclusioni citoplasmatiche nei motoneuroni, consistenti in complessi proteici ubiquitinati (Leigh *et al*., 1991) (fig. 1D). Solo più recentemente (Neumann *et al*., 2006; Arai *et al*., 2006) è stata identificata in queste inclusioni motoneuronali una TAR DNA binding protein (TDP-43), che è presente anche nelle inclusioni immunoreattive per ubiquitina di altre malattie neurodegenerative, quali alcune demenze fronto-temporali (FTD) tau-negative (FTLD-U) (Cairns *et al*., 2007; Davidson *et al*., 2007) e la corea di Huntington. TDP-43 è una proteina nucleare di 414 aminoacidi codi-

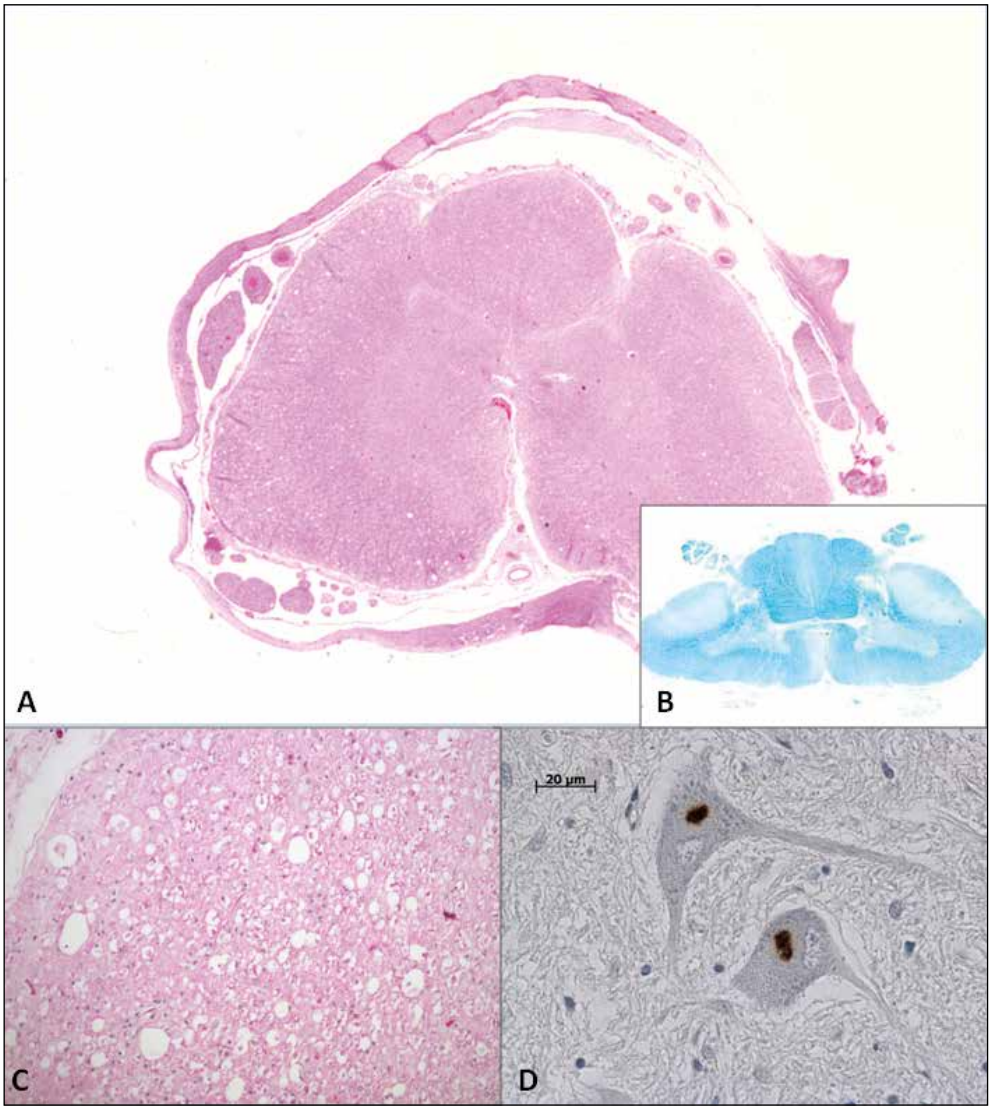


Fig. 1. A. Cane, Pastore tedesco affetto da mielopatia degenerativa. Midollo spinale. Demielinizzazione e degenerazione assonale associata (colorazione Ematossilina-Eosina). B. Paziente affetto da SLA. Midollo spinale. Demielinizzazione dei fasci piramidali (colorazione Luxol fast blue). C. Cane, Pastore tedesco affetto da mielopatia degenerativa, particolare della foto A. D. Paziente affetto da SLA. Midollo spinale. Motoneuroni con inclusioni ubiquitinate (colorazione immunoistochimica per ubiquitina e controcolorazione con Ematossilina).

ficata dal gene TARDBP sul cromosoma 1, ubiquitariamente espressa nei tessuti (Buratti *et al*., 2001). Le funzioni fisiologiche di TDP-43 sono molteplici: interazione con DNA o RNA a catena singola e con proteine che utilizzando meccanismi differenti sono coinvolte nella

regolazione di svariati processi biologici (Buratti *et al*., 2001; Wang *et al*., 2004). Nelle inclusioni citoplasmatiche dei motoneuroni TDP-43 si accumula in forme molecolari anomale in quanto altamente fosforilate, ubiquitinate e tronche (Neumann *et al*., 2009). Su queste basi TDP-43 è considerata una delle proteine maggiormente implicate nella patogenesi della SLA (Kwong *et al*., 2007). Il ruolo dominante e specifico di TDP-43 nella SLA è sostenuto anche dalle segnalazioni di mutazioni del gene di TDP-43 in casi di SLA famigliare e sporadica (van Deerlin *et al*., 2008). La causa e i meccanismi implicati nelle alterazioni strutturali di TDP-43, delocalizzazione, ubiquitinazione e accumulo intracellulare, così come il ruolo che svolgono nella degenerazione dei motoneuroni non sono completamente precisati.

La mielopatia degenerativa (DM) del cane è una malattia neurodegenerativa nota da oltre 40 anni come una patologia spontanea spinale che colpisce diverse razze canine (Averill, 1973) caratterizzata da deficit propriocettivi e atassia bilaterale, spesso simmetrica a decorso progressivo, e successivamente paresi degli arti pelvici (Averill, 1973; Griffiths e Duncan, 1975). La patologia colpisce più frequentemente i cani adulti/anziani oltre i 5 anni di età (età media 8 anni) di grossa taglia e ha un'alta incidenza nei Pastori Tedeschi, per questo in passato era nota come mielopatia del Pastore Tedesco (Braund e Vandevelde, 1978). Tra le altre razze sono particolarmente colpiti i Pembroke Welsh Corgi, Siberian husky, Boxer, Kuvasz, Rhodesian ridgeback, Chesapeacke Bay retriever e Bernesi. A oggi è stata confermata in oltre 24 razze (Coates e Wininger, 2010; Zeng *et al*., 2014) e ipotizzata in altre 9 (Coates e Wininger, 2010). Non è stata osservata una predilezione di sesso. L'esordio è solitamente insidioso, facilmente confondibile con una displasia. All'inizio occasionalmente è presente un coinvolgimento asimmetrico di grado medio degli arti pelvici e in una piccola percentuale di pazienti (10-20%) si può osservare riduzione monolaterale o bilaterale del riflesso patellare. In presenza di un tono muscolare normale o aumentato negli arti pelvici e in assenza di atrofia muscolare del quadricipite femorale, la riduzione del patellare potrebbe rappresentare una disfunzione della componente sensitiva dell'arco riflesso. Come si correli con l'assonopatia è ancora sconosciuto. Benché ci siano lesioni anche nei tratti cervicali, è comunque raro, in questa prima fase, trovare segni neurologici a carico degli arti toracici (de Lahunta e Glass, 2009). I segni clinici più evidenti comunemente sono rappresentati da atassia spinale e successivamente paraparesi degli arti pelvici. La risposta normale dei riflessi spinali degli arti posteriori indica un coinvolgimento dei motoneuroni superiori (Averill, 1973). La debolezza asimmetrica spesso riportata in questi stadi progredisce fino a paraplegia. Negli stadi finali si possono osservare iporiflessia dei riflessi miotattici e flessori (Averill, 1973; Griffith e Duncan, 1975; Bichsel *et al*., 1983; Matthews e de Lahunta, 1985; Coates *et al*., 2007). Comunque se si riscontra iporiflessia degli arti pelvici e coinvolgimento delle radici nervose si può parlare di mielopatia degenerativa o radicolomielopatia (Griffith e Duncan, 1975). Qualora l'eutanasia venga ritardata, i segni clinici progrediscono coinvolgendo gli arti toracici fino a esibire segni da motoneurone inferiore quali tetraparesi flaccida ascendente, atrofia muscolare generalizzata e iporiflessia di tutti gli arti. L'elettromiografia può essere indicativa negli stadi finali rivelando attività spontanea multifocale nella muscolatura distale appendicolare; potenziali di fibrillazione e onde acute positive sono le più significative anomalie del tracciato rilevate. Negli stadi iniziali non si osserva attività spontanea e la velocità di conduzione nervosa è entro i limiti. Sinora non sono stati identificati parametri liquorali specifici utili ai fini diagnostici, benché siano state rilevate alterazioni nella composizione proteica (Oji *et al*., 2007; Kamishina *et al*., 2008). Poiché molte malattie spinali possono dare sintomi clinici analoghi alla DM, una diagnosi clinica di DM può essere raggiunta solo per esclusione. Si considerano quindi tre livelli diagnostici: il primo è clinico ed è esclusivamente indicativo della localizzazione neuro-anatomica (presenza di atassia spinale e paraparesi progressiva del tratto toraco-lombare [T3-L3]); il secondo prevede l'utilizzo della diagnostica per immagini,

soprattutto della TAC o della risonanza magnetica per escludere ogni forma compressiva e non intra- ed extramidollare (Jones *et al*., 2005). La conferma è solo data dall'esame istopatologico che rappresenta perciò il terzo livello diagnostico (Awano *et al*., 2009). Il decorso è progressivo in un tempo variabile in genere da pochi mesi a 15 mesi, anche se alcuni animali possono sopravvivere fino a 3 anni. Porta inevitamente all'incapacità dell'animale di reggersi in piedi. In genere il proprietario richiede l'eutanasia entro un anno dall'esordio dei sintomi clinici quando l'animale diventa paraplegico (Johnston *et al*., 2000). Non ci sono attualmente trattamenti efficaci disponili che rallentino la degenerazione neuronale e assonale. Sono stati molto usati trattamenti con acido aminocaproico, ma senza base scientifica per il loro utilizzo; integrazioni con vitamine E e B12 sono frequenti per la loro efficacia in molti processi degenerativi, ma non ci sono studi specifici riguardo il loro impiego in questa patologia. Trattamenti con S-adenosilmetionina per il suo ruolo come donatore di metili nel mantenimento della mielina e degli assoni non hanno dato benefici (de Lahunta e Glass, 2009). Recenti sudi ritengono che la fisioterapia associata a massaggi e idroterapia siano l'unica possibilità per prolungare la vita dei pazienti. La maggior parte degli animali deve comunque essere sottoposta a eutanasia per aggravamento della malattia.

Questa patologia determina lesioni degenerative per lo più spinali (segmenti toraco-lombari) ed è stata definita una malattia del motoneurone superiore (Averill, 1973, Griffith e Duncan, 1975). Nel Pastore tedesco le lesioni sono solitamente discontinue, bilaterali e asimmetriche. Possono essere colpiti tutti i funicoli di sostanza bianca, anche se in genere le lesioni predominano nella porzione dorsale del funicolo laterale e nel funicolo dorsale (Griffith e Duncan, 1975). Possono essere colpiti tutti i tratti spinali, anche se di solito i segmenti toracici caudali e lombari craniali hanno lesioni più gravi, fenomeno a tutt'oggi non del tutto spiegato. Altri tratti propriocettivi e motori possono comunque presentare lesioni seppur moderate. La degenerazione assonale di tipo walleriano è la lesione più evidente (Averill, 1973; Braund e Vandevelde, 1978; Bichsel *et al*., 1983) associata a demielinizzazione secondaria con frammentazione e fagocitosi degli assoni e dei detriti mielinici. Una moderata astrogliosi accompagna le lesioni degenerative (fig. 1A-C). Nelle altre razze la distribuzione e la tipologia delle lesioni è molto simile, con minime variazioni nei funicoli coinvolti (Bichsel *et al*., 1983; Matthews e de Lahunta, 1985). Nei Pembroke corgi le aree coinvolte corrispondono a tratti spino-cerebellari dorsali e ventrali, e in parte a tratti discendenti da motoneuroni superiori coinvolgenti probabilmente tratti cortico-spinali laterali, rubro-spinali, reticolospinali midollari, al fascicolo gracile e a fibre afferenti propriocettive inconscie (March *et al*., 2009). Nei Pastori tedeschi le lesioni coinvolgono soprattutto i tratti discendenti delle colonne dorso-laterali e in particolare le regioni del tratto corticorubrospinale e il fascicolo gracile cervicale. Gliosi è presente nella sostanza grigia intermedia soprattutto lombare, associata a multifocale cromatolisi neuronale. Non sono state osservate lesioni nei gangli delle radici dorsali. In alcuni casi le fibre delle radici nervose dorsali lombari possono presentare segni di degenerazione. I neuroni motori delle corna ventrali in genere non sono colpiti (Johnston *et al*., 2000). Se gli animali vengono mantenuti in vita nonostante l'insorgere della paraplegia, il successivo peggioramento e la conseguente tetraplegia si accompagnano a segni evidenti da coinvolgimento dei motoneuroni inferiori. Negli stadi finali infatti i muscoli possono mostrare variabilità di diametro delle miofibre e gruppi più o meno grandi di fibre atrofiche da denervazione. Campioni di nervi periferici presentano degenerazione assonale di grado variabile, fibrosi endonevriale e demielinizzazione (Awano *et al*., 2009).

Nel Pastore tedesco sono colpiti anche alcuni neuroni del tronco encefalico caudale (nucleo rosso, nuclei vestibolari laterali, nucleo fastigiale e nucleo dentato). La loro lesione non è sufficiente a spiegare il grado e la localizzazione dell'assonopatia, anche se sembra più probabile una reazione retrograda secondaria (Johnston *et al*., 2000). Non risultano riportate lesioni si-

mili in altre razze. Circa la presenza di inclusioni proteiche citoplasmatiche nel pirenoforo e nei neuriti negli animali affetti da MD, Johnston *et al*. (2000) hanno osservato accumuli neuronali di ubiquitina con ampie variazioni di espressione a seconda dell'animale e dei neuroni. Anche gli anticorpi SMI-31 e RT-97 specifici per neurofilamenti fosforilati hanno dimostrato un'estrema variabilità di reazione, con pochi pericari positivi. Ogawa *et al*. (2011) hanno invece riscontrato un significativo aumento di espressione dell'ubiquitina nel neuropilo e nelle cellule gliali in tutti gli animali con MD, ipotizzando che proteine sconosciute ubiquitinate possano essere coinvolte nella patogenesi della malattia.

Il ruolo di ERK nel determinismo della neurodegenerazione nella MD non è sinora mai stato valutato. L'unico studio pubblicato relativo al ruolo di ERK a livello encefalico nel cane (Pugliese *et al*., 2006) è stato condotto su cani anziani con alterazioni comportamentali al fine di correlare le placche beta amiloidi con l'espressione della proteina tau iperfosforilata. Nel suddetto lavoro si è riscontrata l'assenza di correlazione tra le placche, la Tau e l'espressione di MAPK/ERK-P e della chinasi p38 (p38-P) concludendo comunque sulla necessità di eseguire ulteriori studi per chiarire i processi coinvolti nell'invecchiamento.

La patogenesi della MD resta sconosciuta. Sono state ipotizzate da diversi ricercatori anomalie nel sistema immunitario quali patologia cronica demielinizzante immuno-mediata o encefalomielite allergica (Waxman *et al*., 1980a; Waxman *et al*., 1980b; Barclay e Haines, 1994), ma le relazioni con la patologia non sono state definite. Tentativi di evidenziare particelle virali (Retrovirus) finora non hanno dato esito positivo (de Lahunta e Glass, 2009). Sono state riportate turbe del sistema digestivo (Williams *et al*., 1984) e carenze vitamiche (Williams *et al*., 1985; Johnston *et al*., 2001; Fechner *et al*., 2003), ma le loro relazioni con la MD non sono chiare. Un difetto neuronale con alterazione del trasporto assonale è l'ipotesi più probabile, anche se il coinvolgimento di molti segmenti assonali di vari tratti non si spiega se non con un difetto coinvolgente anche le cellule gliali di supporto e mantenimento assonale (March *et al*., 2009).

La DM presenta molte similitudini con la SLA. E' infatti una malattia spontanea progressiva del cane adulto che porta a paralisi e morte. I reperti patologici sono molto simili. Analogamente è stata osservata la presenza di mutazioni genetiche associate allo sviluppo della malattia. In particolare Awano *et al*. (2009) hanno dimostrato, in cani affetti da MD appartenenti a diverse razze, l'esistenza di una transizione G/A nel gene che codifica l'enzima superossido dismutasi 1 (SOD1) con frequenza molto variabile tra le razze (Zeng *et al*., 2014). Tutti i cani affetti da MD sono risultati omozigoti per l'allele mutante A/A. Tra i cani asintomatici alcuni sono pure risultati omozigoti A/A. Gli eterozigoti A/G, pur asintomatici, presentavano una forte positività per gli antigeni SOD1, mentre i cani omozigoti G/G risultavano negativi per tali antigeni. In un recente lavoro del nostro gruppo (Capucchio *et al*., 2014) per valutare la presenza di mutazioni SOD1, in una popolazione di 47 cani, è stato riscontrato un animale omozigote A/A con lesioni degenerative spinali all'esame anatomo-patologico e un eterozigote A/G che all'esame istologico spinale mostrava lesioni degenerative di grado moderato. In analogia con i casi umani di SLA, inoltre, nei cani con MD alcuni autori hanno osservato una positività citoplasmatica neuronale ed astrocitaria per antigeni specifici per SOD1 alle reazioni immunoistochimiche, ipotizzando un possibile meccanismo tossico intracellulare (Awano *et al*., 2009; Nakamae *et al*., 2015). Sempre molto recentemente Ogawa *et al*. (2015) hanno riscontrato anomalie nel processo di autofagia in cani affetti da DM analogamente a quanto è noto verificarsi nella SLA (Sasaki, 2011; Chen *et al*., 2012). Tuttavia tra gli omozigoti la prevalenza e l'età di esordio dei sintomi risultano estremamente variabili tra le razze, suggerendo l'esistenza di altri fattori genetici coinvolti. Utilizzando il sequenziamento genico con il metodo "genome wide association" Ivansson *et al*. (2016) hanno individuato nei Pembroke Welsh Corgi un ulteriore locus modificato sul cromosoma 25 e in particolare una

mutazione riguardante la proteina SP110, una proteina nucleare immunomodulante, presente nel 40% degli animali affetti associata a precoce esordio clinico, il cui ruolo deve essere ulteriormente chiarito.

Il cane appare pertanto essere un buon modello spontaneo di SLA con l'ipotesi di una malattia su base genetica la cui progressione e distribuzione delle lesioni è molto simile in particolare alle forme di SLA con coinvolgimento del motoneurone superiore.

Indagini genetiche e anatomo-patologiche su questa specie animale possono pertanto essere di fondamentale importanza per chiarire meglio i meccanismi patogenetici della SLA e fornire un valido contributo per la ricerca di potenziali nuovi approcci terapeutici.

Bibliografia

- Abel O, et al. (2013) Development of a Smartphone App for a Genetics Website: The Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Genetics Database (ALSoD). JMIR Mhealth Uhealth 1(2):e18.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H et al (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Biochem Biophys Res Commun 351:602-611.
- Averill DR: Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd Dog: clinical and pathologic findings. J Am Vet med Assoc 162:1045-1051, 1973.
- Awano T, et al. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 2794-9, 2009.
- Barclay KB, Haines DM: Immunohistochemical evidence for immunoglobulin and complement deposition in spinal cord lesions in degenerative myelopathy in German Shepherd Dogs. Can J Vet Res 58(1): 20–24, 1994.
- Bichsel P, Vandevelde M, Lang J, Kull-Hachler S: Degenerative myelopathy in a family of Siberian husky dogs. J Am Vet Med Assoc 183(9): 998–1000,1983.
- Braund KG, Vandevelde M: German Shepherd Dog myelopathy—a morphologic and morphometric study. Am J Vet Res 39(8): 1309–1315, 1978.
- Buratti E, Dörk T, Zuccato E et al (2001) Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon skipping. EMBO J 20:1774-84.
- Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH et al (2007) TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. Am J Pathol 171:227-240
- Capucchio M.T., Spalenza V., Biasibetti E., Bottero M.T., Rasero R., Dalmasso A., Sacchi P. Degenerative Myelopathy in German Shepherd Dog: comparison of two molecular assays for the identification of the SOD1:c.118G>A mutation. Molecular Biology Reports 41(2): 665-70, 2014.
- Chen S, Zhang X, Song L, et al. Autophagy dysregulation in amyptrophic lateral sclerosis. Brain Pathol . 2012; 22:110–116.
- Coates JR, March PA, Oglesbee M, Ruaux CG, Olby NJ, Berghaus RD, O'Brien DP, Keating JH, Johnson GS, Williams DA: Clinical characterization of familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. J Vet Intern Med 21(6): 1323–1331, 2007
- Coates JR, Wininger FA (2010) Canine degenerative myelopathy. Vet Clin North Am Small Anim Pract 40(5):929–950.
- Davidson Y, Kelley T, Mackenzie IR et al (2007) Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein, TDP-43. Acta Neuropathol (Berl) 113:521-533.
- De Lahunta A, Glass E: Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology, 3rd ed., WB Saunders, Philadelphia, PA, 2009. p 262-63.
- Fechner H, Johnston PE, Sharp NJ, Montague P, Griffiths IR, Wang X, Olby N, Looman AC, Poller W, Flegel T. Molecular genetic and expression analysis of alpha-tocopherol transfer protein mRNA in German shepherd dogs with degenerative myelopathy. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 116(1-2):31-6, 2003.
- Griffiths IR, Duncan ID: Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. J Small Anim Pract 16(8): 461–471, 1975
- Gros-Louis, F., Gaspar, C., Rouleau, G. (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Biochimica et Biophysica Acta, 1762:956-972.
- Ivansson EL, Megquier K, Kozyrev SV, Murén E, Körberg IB, Swofford R, Koltookian M, Tonomura N, Zeng R, Kolicheski AL, Hansen L, Katz ML, Johnson GC, Johnson GS, Coates JR, Lindblad-Toh K.Variants within the SP110 nuclear body protein modify risk of

canine degenerative myelopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(22):E3091-100.
– Jones JC, Inzana KD, Rossmeisl JH, Bergman RL, Wells T, Butler K. CT myelography of the thoraco-lumbar spine in 8 dogs with degenerative myelopathy. J Vet Sci. 6(4):341-8, 2005.
– Johnston PEJ, Barrie JA, McCulloch MC, Anderson TJ, Griffiths IR: Central nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. Vet Rec 146(22): 629–633, 2000
– Johnston PEJ, Knox K, Gettinby G, Griffiths IR: Serum a-tochopherol concentrations in German Shepherd Dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. Vet Rec 148:403–407, 2001
– Kamishina H, Oji T, Cheeseman JA, Clemmons RM. Detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid from German Shepherd dogs with degenerative myelopathy by isoelectric focusing and immunofixation. Vet Clin Pathol. 37(2):217-20, 2008.
– Kwong LK, Neumann M, Sampathu DM et al.. (2007) TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. Acta Neuropathol (Berl) 114:63-70
– Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, al (1991) Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution and specificity. Brain 114: 775-788.
– Majounie E, Renton AE, Mok K, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. Lancet Neurol 2012;11:323-330
– March PA, Coates JR, Abyad RJ, Williams DA, O'Brien DP, Olby NJ, Keating JH, Oglesbee M. Degenerative Myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi Dogs. Vet Pathol 46:241–250 (2009)
– Matthews NS, de Lahunta A: Degenerative myelopathy in an adult miniature poodle. J Am Vet Med Assoc 186(11): 1213–1215, 1985
– Nakamae S, Kobatake Y, Suzuki R, Tsukui T, Kato S, Yamato O, Sakai H, Urushitani M, Maeda S, Kamishina H. Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy Neuroscience. 2015 ;303:229-40.
– Neumann M, Kwong LK, Lee EB et al. (2009) Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. Acta Neuropathol. 117:137-49.
– Neumann M, Sampathu DM, Kwong LKet al (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science 314:130-133.
– Ogawa M, Uchida K, Yamato O, Mizukami K, Chambers JK, Nakayama H. Expression of Autophagy-Related Proteins in the Spinal Cord of Pembroke Welsh Corgi Dogs With Canine Degenerative Myelopathy Vet Pathol. 2015;52(6):1099-107.
– Oji T, Kamishina H, Cheeseman JA, Clemmons RM. Measurement of myelin basic protein in the cerebrospinal fluid of dogs with degenerative myelopathy. Vet Clin Pathol. 36(3):281-4, 2007.
– Pasinelli P, Brown RH (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. Nat Rev Neurosci 7:710-723.
– Pugliese M., Mascort J., Mahy N., Ferrer I. (2006) Diffuse beta-amyloid claque and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits. Acta Neuropathol. 112(2) : 175-183.
– Rosen DR, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated
– with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362(6415):59–62.
– Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.

– J Neuropathol Exp Neurol . 2011;70:349–359.
– Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM et al (2008) TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. Lancet Neurology 7:409-16
– Wang HY, et al (2004) Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. Genomics.83:130-9.
– Waxman FJ, Clemmons RM, Johnson G, Evermann JF, Johnson MI, Roberts C, Hinrichs DJ: Progressive myelopathy in older German Shepherd Dogs. I. Depressed response to thymus-dependent mitogens. J Immunol 124(3): 1209–1215, 1980a
– Waxman F.J., RM Clemmons and DJ Hinrichs. Progressive myelopathy in older German shepherd dogs. II. Presence of circulating suppressor cells. *The Journal of Immunology*, 1980b, 124, 1216 -1222.
– Wlliams, D. A., Batt, R. M., Sharp, N. J. H. (1984) Degenerative myelopathy in German shepherd dogs: an association with mucosal biochemical changes and bacterial overgrowth in the small intestine. Clinical Science 66, 25
– Williams, D.A., Prymak, C., Baughan, J., 1985. Tocopherol (vitamin E) status in canine degenerative myelopathy. American College of Veterinary Internal Medicine 3rd Annual Meeting
– Zeng R, et al. (2014) Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. J Vet Intern Med 28(2):515–521

LA SINDROME DI ELLIS-VAN CREVELD NEL BOVINO. CONDIVISIONE UOMO-BOVINO DI UN TIPO DI CONDRODISPLASIA SU BASE GENETICA

LUISA VERA MUSCATELLO[1], GIANCARLO AVALLONE[1], KEREN ELIZABETH DITTMER[2], KEITH GORDON THOMPSON[2], GIUSEPPE SARLI,[1] BARBARA BRUNETTI[1], LEONARDO MURGIANO[3], ARCANGELO GENTILE[1], GERMANA BEHA[1], MICHELA LEVI[1], VALERIA PELLEGRINO[1], CINZIA BENAZZI[1]

[1] Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna;
[2] Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, New Zealand;
[3] Institute of Genetics, Vetsuisse Faculty, Switzerland

La sindrome di Ellis-van Creveld, altresì nota come displasia condroectodermica (Shi *et al*., 2015) è una displasia scheletrica che occorre nella specie umana. EvC è causata da una mutazione autosomica recessiva caratterizzata da piccola statura, brevità degli arti e delle coste (Ruiz-Perez *et al*., 2007), ritardo della crescita, polidattilia delle mani (il cosiddetto "nanismo a 6 dita delle mani") (Schmidts, 2014), displasia delle unghie e dei denti (Baujat e Le Merrer, 2007). Nell'uomo, nel 60% dei pazienti, sono presenti anche difetti cardiaci, in particolare al setto interatriale (Alves-Pereira *et al*., 2009) e alterazioni dell'apparato genitale quali epispadia, ipospadia e criptorchidismo (Baujat e Le Merrer, 2007). La morte sopravviene per insufficienza cardio-respiratoria causata da costrizione del torace oppure per insufficienza renale o epatica o anche come conseguenza di insufficienza cardiaca primaria per difetti congeniti del cuore (Schmidts, 2014).

Questa sindrome è considerata espressione di una classe di malattie emergenti denominate ciliopatie (Jose, 2006) e la terminologia "condrodisplasie ciliari" ben si associa ai difetti dell'apparato osseo che la caratterizzano (Schmidts, 2014). Difetti di formazione o di funzione delle cilia influiscono sullo sviluppo di numerosi organi e apparati in quanto fondamentali per la polarizzazione della divisione cellulare (Huber e Cormier-Daire, 2012). Infatti, le cilia primarie giocano un ruolo vitale nella trasduzione di importanti segnali per lo sviluppo scheletrico quali quelli della pathway Hedgehog (Huber e Cormier-Daire, 2012). Le proteine ciliari sono essenziali per lo sviluppo degli abbozzi degli arti e del tubo neurale (Huangfu et al., 2003) influenzando il pathway di Sonic Hedgehog (*SHH*), che regola l'abbozzo antero-posteriore degli arti (Ruiz-Perez *et al*., 2007). Un'alterazione di *SHH* può così indurre polidattilia e difetti cranio-facciali, difetti di sviluppo di occhio, peli e polmone e anomalie di sviluppo dei genitali esterni, quali quelli che si riscontrano nella sindrome di Ellis-van Creveld (Tobin e Beales, 2009).

La prima segnalazione della sindrome è di McIntosh e risale al 1933 (Baby *et al*., 2016), ma furono Richard W.B. Ellis di Edimburgo e Si-

Figura 1: Vitello di razza Grigia Alpina con accorciamento sproporzionato degli arti, in particolare anteriori, che sono inarcati "a manubrio" con rotazione angolare mediale esterna indicativa di varismo.

Figura 2: Sezione longitudinale di femore caratterizzata da una grave riduzione della lunghezza totale dell'osso, dovuta ad un marcato accorciamento della diafisi e apparente prominenza delle epifisi.

mon van Creveld di Amsterdam a descriverla per primi nel 1940 e attribuire a essa il nome di sindrome EvC, dalle iniziali dei loro cognomi (Ellis e van Creveld, 1940).

I primi casi di EvC furono riscontrati predominantemente nella popolazione Amish, in Pennsylvania (USA) (McKusick, 1964). Questo era dovuto alla forte consanguineità all'interno di un numero estremamente limitato di soggetti facenti parte della comunità, in cui l'incidenza è stimata di 5 casi per 1000 bambini nati vivi (McKusick, 1964), contro in 1 su 60.000/200.000 nascite nel resto del mondo, con frequenza simile nei maschi e nelle femmine (Mehndiratta *et al*., 2011). La frequenza dei portatori nella popolazione Amish si attesta sul 13% (McKusick, 2000), con una mortalità in più del 50% dei soggetti con manifestazioni cliniche (McKusick *et al*., 1964).

La sindrome nell'uomo deriva da una mutazione dei geni *EVC* o *EVC2*, localizzati sul braccio corto distale del cromosoma 4 (Ruiz-Perez et al., 2003). Il gene *EVC H*, identificato nel 2000, controlla lo sviluppo della proteina EVC (o EVC1), mentre *EVC2*, identificato nel 2002 nel bovino (Takeda *et al*., 2002) e in seguito in medicina umana (Galdzicka *et al*., 2002), codifica per una proteina denominata limbina o EVC2. Entrambi i geni, *EVC* ed *EVC2*, sono regolatori della via Hedgehog (Ruiz-Perez *et al*., 2007), particolarmente importante per lo sviluppo scheletrico (Huber e Cormier-Daire, 2012). Individui omozigoti per mutazioni in *EVC1* o *EVC2* sono tra loro fenotipicamente indistinguibili (Ruiz-Perez *et al*., 2003). Entrambi i geni *EVC* ed *EVC2* codificano per delle proteine transmembrana localizzate nei corpi basali delle cilia primarie (Kamal et al., 2010). A seguito di tale mutazione, si ha la conseguente formazione di proteine troncate e la perdita della funzione (Ruiz-Perez e Goodship, 2009). Le cilia primarie sono elementi cruciali per lo sviluppo di numerosi apparati e i loro difetti possono offrire una plausibile ipotesi per sindromi che coinvolgono molti sistemi dell'organismo (Baby *et al*., 2016), tra i quali l'apparato respiratorio e, se coinvolte, le cilia primarie dei condrociti, quello scheletrico (Ruiz-Perez e Goodship, 2009). È infatti per problemi cardio-respiratori che un terzo dei pazienti con sindrome EvC muoiono prematuramente o durante l'infanzia (Baby *et al*., 2016). Come descritto da McKusik *et al*. nel 1964 nella popolazione Amish, la morte avveniva entro 6 mesi dalla nascita e iniziava per problemi alla dinamica cardiaca a causa delle malformazioni al cuore aggravate da torace di dimensioni ridotte.

Analogamente all'uomo, anche nel bovino è nota la sindrome EvC determinata da mutazioni nei geni *EVC* e *EVC2* che, a differenza dalla specie umana, sono situati sul cromosoma 6. I soggetti affetti presentano una forma genetica di nanismo condrodisplasico (Murgiano et al., 2014).

Nel bovino sono descritti in letteratura numerosi tipi di condrodisplasia a eziologia genetica,

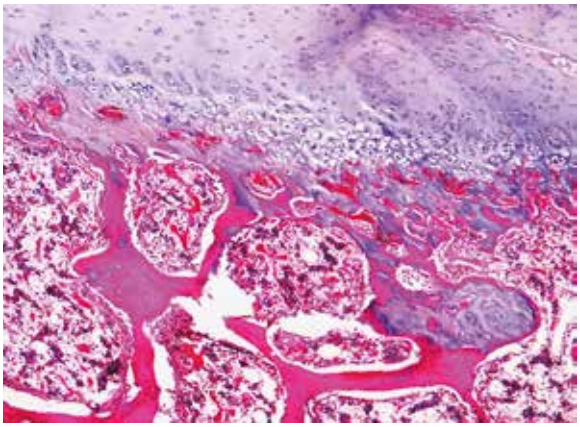


Figura 3: Fisi di vitello condrodisplasico contraddistinta da espansione della zona di riserva, riduzione delle zone proliferativa e ipertrofica, con perdita della architettura colonnare dei condrociti e ritenzione di isole di cartilagine nella metafisi (ematossilina ed eosina, 4x).

classificati in base alle loro caratteristiche morfologiche in: Bulldog, Telemark, Snorter (brachicefalico), long-headed (dolicocefalico) e Ellis-van Creveld (Craig *et al*., 2016).

La forma più grave è il tipo Bulldog che si riscontra nella razza Dexter, Jersey, Scottish Highland, Holstein e Belted Galloway, che provoca aborto entro il settimo mese di gravidanza. I bovini Dexter, con caratteristica brevità degli arti, sono eterozigoti con dominanza incompleta; qualora siano omozigoti mostrano il fenotipo Bulldog. I vitelli Bulldog hanno arti estremamente corti e arcuati, una testa breve e a forma di cupola, e mandibola procidente e palatoschisi. La colonna vertebrale è più corta del normale. La forma Telemark è anch'essa letale ed è ereditata con un meccanismo autosomico recessivo: i vitelli affetti, generalmente di razza Jersey, nascono vivi, ma la morte sopraggiunge poco dopo per asfissia. I soggetti con lesioni meno marcate (testa larga, deformità della mandibola, palatoschisi e rotazione degli arti) sono vitali. Il nanismo brachicefalico ereditario di tipo Snorter, riportato in razze provenienti dagli USA e nella razza Angus, è ereditato anch'esso con un meccanismo autosomico recessivo, ma che appare parzialmente espresso nei soggetti eterozigoti, alcuni dei quali sono leggermente più piccoli e più compatti del normale. I soggetti Snorter hanno testa larga, fronte prominente, colonna vertebrale accorciata e respiro difficoltoso (da cui il termine inglese Snorter o "sbuffante"). Il tipo dolicocefalico è leggermente più grande del brachicefalico, ma la differenza principale è la testa proporzionalmente molto più lunga, che si assottiglia in un muso stretto (Craig *et al*., 2016).

La forma di condrodisplasia analoga alla sindrome di Ellis-van Creveld è stata descritta per la prima volta nel bovino da Takeda *et al*. nella razza Japanese Brown nel 2002, e nella Grigia Alpina da Murgiano *et al*. nel 2014. Nei bovini di razza Japanese Brown è stato identificato il gene causale della condrodisplasia, il gene *LIMBIN*, corrispondente al gene *EVC2* dell'uomo, coinvolto nello sviluppo del tessuto osseo e nel tessuto cardiaco e renale dell'adulto. Sono due le mutazioni causative identificate: una sostituzione (2054–2055delCAinsG), e una delezione (56 basi in posizione 1355-1410 sull'esone 11), che provocano una mutazione di tipo frame-shift, con la produzione di una proteina tronca. Queste mutazioni sono considerate responsabili di un nanismo condrodisplasico analogo alla sindrome di Ellis-van Creveld dell'uomo (Takeda *et al*., 2002). Successivamente, nella razza Grigia alpina, è stata descritta una delezione di 2bp sull'esone 19 del gene *EVC2* che porta alla formazione di un segnale di stop precoce e associata anch'essa a un nanismo condrodisplasico analogo alla sindome di Ellis-van Creveld dell'uomo (Murgiano *et al*., 2014). A livello molecolare, in conseguenza della delezione presente nel gene *EVC2* nei vitelli affetti da condrodisplasia, è stato ipotizzato un meccanismo di "decadimento mediato da un nonsenso", grazie al

quale l'RNA mutato viene degradato. Alternativamente, è possibile che le proteine troncate possano essere degradate prima di causare una condizione patologica (Murgiano *et al*., 2014). Sorprendentemente, la RT-PCR su campioni di osso ha rivelato la presenza dei trascritti di *EVC* ed *EVC2* nei soggetti affetti, dato indicativo di un mantenimento della trasduzione dell'mRNA e del possibile intervento di un meccanismo post-trasduzionale di regolazione della proteina difettosa (Muscatello *et al*., 2015).

Nei bovini di razza Grigia Alpina in cui è stata identificata la mutazione del gene *EVC2*, che presentavano un comune progenitore di sesso femminile, il sensorio era normale, ma i soggetti avevano difficoltà ad alzarsi e a mantenere la stazione quadrupedale e presentavano un'andatura barcollante. Gli arti erano corti e arcuati a manubrio, forma determinata da un abnorme allineamento assiale degli stessi, accompagnato da lassità legamentosa, responsabile dell'andatura traballante. In un caso era presente un'iperestensione bilaterale di tutte le articolazioni degli arti posteriori, risultante in una contrazione spastica dei muscoli degli arti, mentre in un altro si osservava un profilo dorsale declinante caudalmente che lo faceva somigliare ai soggetti affetti dalla "malattia della iena" (Espinasse *et al*., 1986).

Questi soggetti si caratterizzavano per femore e omero di lunghezza inferiore rispetto alla norma, con un accorciamento più grave a carico dell'omero (condrodisplasia rizomelica). In questi vitelli sono state inoltre descritte lesioni extrascheletriche riportate anche nell'uomo, tra cui una degenerazione mixomatosa della valvola mitrale, cardiomegalia, dilatazione del tronco comune dell'arteria polmonare e forame ovale pervio, e criptorchidismo (Muscatello *et al*., 2015). Al contrario dell'uomo, non sono state riscontrate polidattilia o displasia ectodermica che colpisse il pelo, gli unghielli o i denti (Muscatello *et al*., 2015).

Istologicamente le principali alterazioni erano a carico delle fisi delle ossa lunghe, nelle quali è stato descritto un ispessimento irregolare, caratterizzato da un'espansione della zona di riserva e un accorciamento della zona proliferativa e ipertrofica con perdita del regolare arrangiamento colonnare dei condrociti della cartilagine di accrescimento e isole di osteoide ritenute nella metafisi. Inoltre, occasionalmente è stata evidenziata una duplicazione della fisi (Muscatello *et al*., 2015).

È stato ipotizzato che le alterazioni istologiche a carico delle fisi siano conseguenza di una alterazione nell'espressione di proteine del ciclo cellulare e di fattori di crescita: la mancata espressione di FGF2 a livello di fisi nei soggetti affetti, associata a un più basso indice di proliferazione, suggeriva il coinvolgimento di questo fattore di crescita nella patogenesi della lesione. Inoltre la riduzione dell'espressione di proteine strutturali, nello specifico di collagene II e collagene X, suggeriva un disordine nella normale differenziazione condrocitaria e ossificazione encondrale, analogamente a quanto riscontrato nella condrodisplasia dei bovini di razza Japanese Brown (Soeta *et al*., 2007). La perdita dell'espressione del collagene II nella zona di riserva fa supporre infatti che il collagene II possa essere degradato prematuramente, non per un effetto dell'invecchiamento, bensì per un'accelerata differenziazione dei condrociti della fisi. Il collagene X, marcatore della differenziazione della cartilagine e della deposizione del calcio nella matrice, mancante nei casi di vitelli affetti, faceva supporre una prematura formazione della zona ipertrofica (Muscatello *et al*., 2015). L'espressione di *SHH* non sembrava invece alterata, nonostante si ipotizzi che questa proteina sia coinvolta nella patogenesi delle lesioni della sindrome di Ellis-van Creveld nell'uomo (Schmidt, 2014). Tuttavia Shh è necessario nelle prime fasi dello sviluppo per modellare la forma dello scheletro in modelli murini e alterazioni dello stesso sono collegate alla polidattilia (Huber e Cormier-Daire, 2012), assente nei casi di EvC nei vitelli Grigio-Alpini.

Quanto riportato finora in letteratura prova quindi che le forme di nanismo condrodisplasico descritte nei bovini di razze Japanese Brown e Grigia Alpina sono associate a mutazioni del gene *EVC2*, analogo a quello dell'uomo, rappresentando quindi un potenziale modello naturale per una patologia rara quale la sindrome di Ellis-van Creveld.

Bibliografia

- Alves-Pereira D, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Ellis-van Creveld Syndrome. Case report and literature review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2009 Jul 1;14(7):E340-343.
- Baby TK, Pillai RK, Bindhu PR, Thomas P. Ellis-van Creveld Syndrome: A Case Report of Two Brothers. Oral Maxillofac Pathol J 2016;7(1):698-701
- Craig LE, Dittmer KE, Thompson KG. Bones and Joints. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, M. Grant Maxie Ed.,vol 1,Elsevier, Missouri (USA), 2016.
- Ellis RW e van Creveld S: A syndrome characterized by ectodermaldysplasia, polydactyly, chondrodysplasia and congenital morbus cardia. Arch Dis Child 1940, 15:65.
- Espinasse J, Parodi AL, Constantin A, Viso M, Laval A. Hyena disease in cattle: a review. Vet Rec 1986, 12: 328–330.
- Galdzicka M, Patnala S, Hirshman M, Cai J, Nitowsky , Egeland J, Ginns E. A new gene, EVC2, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome. Molec Genet Metab 2002, 77:291-295.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman A, Murcia N, Niswander L, Anderson K. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. Nature 2003, 426: 83-87.
- Huber C e Cormier-Daire V. Ciliary disorder of the skeleton. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2012 Aug 15;160C(3):165-74.
- Jose BL, Norimasa M, Phil BL, Nicholas K. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. Annu Rev Genomics Hum Genet 2006, 7:125-148).
- Kamal R, Dahiya P, Kaur S, et al. Ellis-van Creveld syndrome: a rare clinical entity. J Oral Maxillofac Pathol. 2013, 17(1):132–135.
- Koefoed K, Veland I R, Pedersen L B, Larsen L A, Christensen ST. Cilia and coordination of signaling networks during heart development. Organogenesis 2014, 10(1): 108–125.
- McKusick VA, Egeland JA, Eldridge R, Krusen DE. Dwarfism in the Amish: I. The Ellis-Van Creveld syndrome. Bull Johns Hopkins Hosp. 1964;115:306–336.
- McKusick VA. Ellis-van Crefeld syndrome and the Amish. Nat Genet. 2000, 24:203–4.
- Mehndiratta S, Tyagi A, Devgan V. Ellis-van Creveld syndrome: report of two cases. World J Pediatr 2011, 7 (4): 368-370.
- Murgiano L, Jagannathan V, Benazzi C, Bolcato M, Brunetti B, Muscatello L V, Dittmer K, Piffer Christian, Gentile Arcangelo, Cord Drögemüller. Deletion in the EVC2 gene causes chondrodysplastic dwarfism in Tyrolean Grey cattle. PLoS One. 2014; 9(4): e94861.
- Muscatello LV, Benazzi C, Dittmer KE, Thompson KG, Murgiano L, Drögemüller C, Avallone G, Gentile A, Edwards JF, Piffer C, Bolcato M, Brunetti B. Ellis-van Creveld Syndrome in Grey Alpine Cattle: Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Characterization. Vet Pathol. 2015 Sep;52(5):957-66.
- Ruiz-Perez VL, Tompson SW, Blair HJ, Espinoza-Valdez C, Lapunzina P, Silva EO, Hamel B, Gibbs JL, Young ID, Wright MJ, Goodship JA. Mutations in two nonhomologous genes in a head to head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome. Am J Hum Genet 2003;72:728-732.
- Ruiz-Perez VL, Blair HJ, Rodriguez-Andres ME, Blanco MJ, Wilson A, Liu YN, Miles C, Peters H, Goodship JA. Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. Development. 2007, 134: 2903-2912.
- Ruiz-Perez VL, Goodship JA. Ellis–van Creveld Syndrome and Weyers Acrodental Dysostosis are caused by ciliamediated diminished response to Hedgehog ligands. Am J Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics). 2009; 151C:341-351.
- Schmidts M. Clinical genetics and pathobiology of ciliary chondrodysplasias. J Pediatr Genet 2014, 3(2): 46–94.
- Shi L, Luo C, Ahmed MK, Attaie A, Ye X. Novel mutations in EVC cause aberrant splic-

ing in Ellis–van Creveld syndrome. Mol Genet Genomics. 2015 Nov 30. [Epub ahead of print]
– Soeta S, Shimoura H, Hatakeyamay N, Kodakaz T, Amasaki H, Yamano S, Taniguchiy K, Naito Y. Immunohistochemical Examination of Epiphyseal Growth Plates of Japanese Brown Cattle with ChondrodysplasiaJ Comp Path. 2007, 136: 145-155.
– Tavella S, Biticchi R, Schito A, Minina E, Di Martino D, Pagano A, Vortkamp A, Horton WA, Cancedda R, Garofalo S. Targeted expression of SHH affects chondrocyte differentiation, growth plate organization, and Sox9 expression. J Bone Miner Res. 2004, 19(10):1678–1688.
– Takeda H, Takami M, Oguni T, et al. Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. Proc Natl Acad Sci . U S A. 2002; 99(16):10549–10554.
– Tobin JL e Beales PL (2009). The nonmotile ciliopathies. Genetics in Medicine, 11 (6), 386-402.

IL RUOLO DEL CANE COME MODELLO ANIMALE NELLA MALATTIA RENALE CRONICA DELL'UOMO

LUCA ARESU

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova

Nel corso degli ultimi 30 anni differenti specie modello sono state introdotte nella ricerca scientifica nel tentativo di replicare le principali malattie dell'uomo. La selezione del modello adeguato è sicuramente un processo lungo ed estremamente costoso; inoltre il rapporto costi/benefici rimane uno dei principali fattori associati al benessere animale e all'applicabilità reale nelle varie fasi sperimentali (2). Dalla letteratura, in base alla specie modello selezionata e alla patologia da riprodurre, sono riportati vantaggi e svantaggi, e diversi criteri sono stabiliti a priori per l'identificazione di un buon modello come anatomia e fisiologia sovrapponibili all'uomo e risposta a stimoli iatrogeni confrontabili in termini di marker clinici e riscontri morfologici con ciò che è descritto nell'uomo (14).

In questo contesto, è noto da tempo come, indipendentemente dall'insulto inziale in grado di provocare un danno renale, l'esito finale è sempre un processo cronico irreversibile caratterizzato da un danno tubulo-interstiziale di varia entità in base al grado e all'evoluzione dello stesso (5,7,12). L'insufficienza renale cronica rappresenta il dato clinico evidente e diversi studi sia nell'uomo sia nel cane hanno dimostrato come ci sia una correlazione direttamente proporzionale tra il grado di danno tubulo-interstiziale e i marker renali a disposizione (6). Entrando più specificatamente nel meccanismo della fibrosi renale, nel cane è stato dimostrato come le diverse componenti del rene compartecipino alla fibrogenesi renale (1). Per definizione, la fibrosi è caratterizzata da eccessivo accumulo di matrice extracellullare (ECM) che comporta una perdita di funzione dell'organo in toto (8,9). Nel rene fibrotico lo spazio interstiziale è aumentato e rimpiazzato da materiale fibrillare, composto prevalentemente da collagene di tipo I e III e da fibronectina. L'eccesso di matrice extracellulare è anche correlato a un aumento del numero di miofibroblasti (11).

L'origine della fibrosi renale è caratterizzata da una serie di eventi che a scopo descrittivo possono essere suddivisi in 4 fasi (13):

1. Iniziazione: rappresenta la prima fase dove, in conseguenza di uno stimolo flogistico o di un insulto a livello glomerulare, cellule infiammatorie, prevalentemente linfociti e plasmacellule, sono in grado di infiltrare lo spazio interstiziale. La mancata risoluzione del processo infiammatorio rappresenta il primo punto di non ritorno, stimolando conseguentemente la fibrosi renale. Linfociti e plasmacellule sono costitutivamente in grado di produrre diversi fattori chemiotattici (ROS, interleuchine, citochine e fattori di crescita); alcuni fattori agiscono in maniera paracrina sulle cellule tubulari e sui fibroblasti attivandoli e causando quello che viene classificato come "circolo vizioso". In questa fase, i primi foci di fibrosi vengono a depositarsi con localizzazione prevalente attorno ai vasi sanguigni (17). Riguardo all'immunofenotipo dei linfociti coinvolti nel processo infiammatorio, è noto come i linfociti T siano determinanti rispetto alla componente B, e in particolare un ruolo fondamentale è svolto dai linfociti T-helper che secernono citochine quali interferone C, tumor necrosis factor (TNF) e interleuchine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10).
2. Attivazione: in questa seconda fase le citochine agiscono sui fibroblasti renali residenti che cominciano a produrre ECM. I fibroblasti attivati dalle citochine vengono caratterizzati

come miofibroblasti attraverso l'espressione di α-SMA e Vimentina.

3. Esecuzione: i miofibroblasti continuano la produzione di ECM, la matrice si accumula e si formano fibrille contenenti collagene di tipo I e III e fibronectina. La maggior produzione di ECM è controllata a livello genico ed è stimolata da diversi fattori, il più importante dei quali è il Trasforming Growth Factor β1 (TGFβ1), considerato il principale promotore coinvolto nella fibrosi renale. Tra le altre funzioni TGFβ1 modula l'attività dei fibroblasti e dei miofibroblasti stimolando la sintesi di proteine della matrice (fibronectina e collagene tipo I). TGFβ1 viene sintetizzato sia da cellule residenti sia da cellule infiammatorie migrate all'interno del parenchima renale sotto lo stimolo di numerosi fattori, quali angiotensina II, endotelina I (ET I), glucosio, insulin-like growth factor (IGF I), fattore natriuretico atriale, fattore attivante le piastrine (PAF), trombossani e alcuni farmaci. Altri fattori coinvolti sono: Platelet-derived growth factor (PDGF), Fibroblastic growth factor (FGF-2), Connective tissue growth factor (CTGF), Angiotensina II. E' interessante come negli stadi iniziali della fibrosi renale il collagene sia sensibile alla proteolisi; la fibrosi in questo stadio è quindi ancora reversibile. Dopo un tempo non ancora stimato a livello sperimentale, il collagene deposto risulta definitivo (19).
4. Progressione: in quest'ultima fase le cellule tubulari diventano bersaglio di numerosi insulti in seguito all'effetto dei diversi fattori chemiotattici prodotti da cellule infiammatorie e miofibroblasti. In risposta a questi insulti le cellule tubulari possono reagire andando incontro a:
   proliferazione,
   autofagia,
   arresto della crescita,
   Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT),
   Apoptosi.

Il processo di iniziazione e di progressione della fibrosi renale accomuna sia il cane sia l'uomo. A esaltare il cane come modello di nefropatia cronica nell'ultimo decennio, alcuni lavori hanno dimostrato come anche in questa specie l'EMT sia un fenomeno ascrivibile ai meccanismi che coinvolgono il tubulo-interstizio durante l'insufficienza renale cronica (3). Nello specifico l'EMT, le cellule tubulari epiteliali subiscono una perdita dei principali marker epiteliali mentre acquisiscono "*de novo*" l'espressione di marker mesenchimali (13). L'EMT è un processo chiave dello sviluppo embrionale e, recentemente, è stato assodato che tale processo è la base dello sviluppo e dell'evoluzione dei tumori in generale e processi infiammatori cronici (4,18). Morfologicamente vengono perse le caratteristiche fenotipiche delle cellule epiteliali come la polarità delle cellule e le giunzioni intercellulari (cellula-cellula e membrana basale-cellula) e vengono acquisite le principali caratteristiche mesenchimali del citoscheletro che provocano un cambiamento della cellula. Un passaggio fondamentale dell'EMT è la rottura della membrana basale tubulare per permettere alle cellule di raggiungere l'interstizio. Questo processo è mediato da una maggiore attività delle Metalloproteinasi 2 (MMP-2) che hanno come target principale il collagene tipo IV, principale costituente della membrana basale. La MMP-2 inoltre aumenta la produzione di TGF-β1, interferendo nell'EMT. La metalloproteinasi 9 (MMP-9) invece diminuisce la sua attività durante il processo di EMT. Questa diminuita attività provoca una minor degradazione del collagene presente nell'interstizio, con conseguente aumento dell'ECM. Inoltre, le cellule epiteliali tubulari normali sono caratterizzate da giunzioni intercellulari specializzate che hanno diverse funzioni come garantire l'adesione cellulare, determinare la permeabilità dell'epitelio, favorire la proliferazione e la differenziazione delle cellule e mantenere l'integrità strutturale e della polarità cellulare. Durante il processo di EMT queste funzionalità vengono gradualmente a perdersi in seguito alla riduzione di due marker fondamentali per l'attività costitutiva delle cellule epiteliali renali: E-Caderina e Beta-catenina (2, 20).

Modello di Malattia Renale Cronica

Sulla base dei dati descritti sopra e sul fatto che i meccanismi legati alla progressione dell'insufficienza renale cronica sono sovrapponibili tra cane e uomo, è stata sviluppata una varietà di modelli sperimentali di danno renale acuto e cronico per soddisfare la diversità e la complessità della condizione umana. Il cane è stato identificato come un ottimo modello sperimentale soprattutto per lo studio di farmaci ad attività anti-fibrotica e molecole con azione sull'apparato cardiovascolare. Il modello sperimentale di nefrectomia 5/6 o il modello di rene residuo rappresentano due delle tecniche più utilizzate per indurre insufficienza renale progressiva nel cane (16). Questo tipo di approccio ha permesso di comprendere come la perdita di una massa critica di nefroni funzionanti sia da sola in grado di innescare meccanismi responsabili per la perdita progressiva dei restanti nefroni residui funzionanti (19). Recentemente diversi studi hanno riportato i meccanismi alla base del danno cronico progressivo nell'approccio nefrectomia 5/6, evidenziando un ordine temporale della comparsa delle lesioni a livello del parenchima renale. In una prima fase si osserva infiltrazione di macrofagi, provocando il rilascio di citochine con induzione dell›apoptosi delle cellule tubulari, attivazione e aumento della proliferazione dei fibroblasti. Successivamente glomerulosclerosi e atrofia tubulare sono lesioni evidenti diffusamente a livello della corticale renale, e infine la classica trasformazione del fenotipo delle cellule epiteliali tubulari renali, nel fenomeno conosciuto come EMT (10).

A oggi, la nefrectomia 5/6 risulta ancora il modello maggiormente utilizzato per lo studio dei processi cronici renali nel cane. I principali vantaggi di questo modello sono testimoniati dalla letteratura di almeno quattro decadi. L'induzione affidabile negli animali e il confronto con il rene rimosso all'induzione del danno sono fondamentali negli studi sperimentali. Questo modello ha chiarito i meccanismi che si traducono in malattia renale cronica secondaria alla perdita di nefroni negli esseri umani. È stato anche utile per lo studio dei meccanismi della malattia glomerulare. Tuttavia, l'intervento chirurgico è difficile e ha un decorso lungo. Inoltre, l'ipertensione secondaria è molto spesso un fattore limitante (14).

Altre tipologie di modelli sperimentali per l'insufficienza renale cronica sono generate attraverso trattamenti farmacologici con ciclosporina A, antibiotici aminoglicosidici o farmaci nefrotossici. Il modello ostruzione unilaterale degli ureteri è uno dei modelli di malattia renale cronica più comunemente usato in topi e ratti ed è stato descritto nel cane, ma il suo utilizzo nel corso nella ricerca sperimentale è risultato ridotto fino a oggi (10).

Modello di Ischemia-Riperfusione ed Emodialisi

La struttura unica, la vascolarizzazione e l'afflusso di sangue nel rene rendono il tubulo estremamente sensibile a fenomeni ischemici e ipossici. Il modello canino è una delle specie più comunemente usate nello studio del danno ischemico acuto. Il tempo necessario per causare un'ischemia e il conseguente danno a livello istologico è in genere intorno ai 30-60 minuti. Le lesioni renali sono caratterizzate dal distacco delle cellule tubulari, degenerazione epiteliale, necrosi e apoptosi ed edema interstiziale con infiltrazione di cellule infiammatorie (prevalentemente polimorfonucleati). Il grado di danno è strettamente correlato ai tempi di ischemia-riperfusione. Nello stesso contesto i cani hanno assunto una posizione di rilievo nello sviluppo delle conoscenze nell'ambito delle cure attraverso dialisi e nel trapianto renale (12). Questa specie è stata oggetto della maggior parte dei successi, almeno inizialmente. Nella fattispecie, nel 1960 il cane risultò il primo modello in cui l'azatioprina dimostrò la sua efficacia come immunosoppresssore nell'allotrapianto renale, guidando lo sviluppo dei trapianti renali umani (16).

Prospettive future

Molte aziende farmaceutiche usano ancora il modello canino per testare lo sviluppo, l'efficacia e la sicurezza di nuovi agenti farmacologici. A oggi, in seguito ad alcune considerazioni etiche, l'utilizzo degli animali da compagnia risulta essere contingentato da stretti regolamenti, e certamente la comunità ha forti sentimenti sull'utilizzo dei cani per scopi di ricerca, ponendo l'accento sulla necessità di severi controlli etici. Tuttavia la ricerca, che passa attraverso modelli animali accuratamente studiati, ben caratterizzati e controllati, rimarrà per molto tempo un passo essenziale per le scoperte fondamentali, per verificare le ipotesi a livello di organismo e per la validazione dei dati umani. I modelli animali dovranno essere costantemente migliorati per fornire dati sempre più affidabili e informativi. Allo stesso modo, una legislatura stringente è necessaria per non ricadere negli sbagli del passato. Solamente l'unione di questi due obiettivi potrà garantire una scienza di alta qualità.

Bibliografia

1. Aresu L, Benali S, Garbisa S, Gallo E., Castagnaro M., 2011. Matrix metalloproteinases and their role in the renal epithelial mesenchymal transition. Histology and Histopathology, 26(3): 307-313.
2. Aresu L., Rastaldi M.P., Pregel P., Valenza, F., Radaelli E., Scanziani E., Castagnaro M., 2008. Dog as model for down-expression of E-cadherin and beta-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. Virchows Archiv, 453(6): 617-625.
3. Aresu L., Rastaldi M.P., Scanziani E., Baily J., Radaelli E., Pregel P., Valenza, F., 2007. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in canine glomerulonephritis. Virchows Archiv, 451(5): 937-942.
4. Cervantes-Arias A., Pang L.Y., Argyle D. J., 2012. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. Veterinary and Comparative Oncology, in press.
5. Churg J., 1982. Renal diseases: Classification and atlas of glomerular diseases, Igaku-Shoin, Tokyo-New York.
6. DiBartola S.P. ‚SECTION XIX - Urinary System, CHAPTER 308 – Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease, 2010. In: Ettinger S.J., Feldman E.C., Textbook of veterinary internal medicine, 7th edition, Elsevier, St. Louis, Missouri, 1955-1969.
7. D'Amico G., 1998. Tubulo-interstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of the renal damage. Nephrology Dialysis Transplantation, 13(1): 80-85.
8. D'Amico G., 2003. Pathophysiology of proteinuria. Kidney Transplantation, 63: 809-825. El-Nahas A.M., 2003. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. Kidney International, 64(5): 1553-1563.
9. Galichon P., Hertig A., 2011. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside? Fibrogenesis & Tissue Repair, 4(1): 1-7.
10. Griffin K., Picken M., Bidani A., 1994. Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury. J. Am. Soc. Nephrol., 4: 2023-31.
11. Hewitson T.D., 2009. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. American Journal of Physiology. Renal Physiology, 296: F1239-F1244.
12. Hood J.C., Dowling J., Bertram J.F., Young R.J., Huxtable C., Robinson W., Savige J., 2002. Correlation of histopathological features and renal impairment in autosomal dominant Alport syndrome in Bull terriers. Nephrology Dialysis Transplantation, 17(11): 1897-1908.
13. Iwano M., Neilson E.G., 2004. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. Current Opinion Nephrology and Hypertension., 13: 279-284.
14. Kujal P., Vernerová Z., 2008. 5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number. Cesk. Fysiol. 2008; 57:104-9.
15. Newman S.J., Confer A.W., Panciera R.J.: Urinary System, 2007. In: McGavin D.M., Zachary J.F., Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4th edition, Elsevier, St. Louis, Missouri, 613-692.
16. Pelayo J., Quan A., 1989. Pathophysiology of glomerular hemodynamic adaptations to nephron loss. Semin. Nephrol., 9:10-3.
17. Yhee J.-Y., Yu C.-H., Kim J.-H., Sur J.-H., 2008. Effects of T Lymphocytes, Interleukin-1, and Interleukin-6 on Renal Fibrosis in Canine End-Stage Renal Disease. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 20(5): 585-592.
18. Zeisberg M., Kalluri R., 2004. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. Journal of Molecular Medicine, 82(3): 175-181.
19. Zeisberg M., Neilson E. G., 2010. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. Journal of the American Society of Nephrology, 21(11): 1819-1834.
20. Zhou D., Li Y., Lin L., Zhou L., Igarashi P., Liu Y., 2013. Tubule-specific ablation of endogenous β-catenin aggravates acute kidney injury in mice. Kidney Int., 84:626.

IL LATTONZOLO E IL VITELLO DA LATTE: MODELLI SPONTANEI PER LO STUDIO DEI COSIDDETTI "INFARTI URICI RENALI" DEL BAMBINO LATTANTE

SILVIA MIOLETTI[1], STEFANO AMEDEO[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; [2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

I calcoli dell'apparato urinario sono conosciuti in tutte le specie di animali domestici e nell'uomo, e sono localizzati prevalentemente a livello renale (nefrolitiasi) e/o della vescica (cistolitiasi) (Piazza e Dalla Palma, 1988). In particolare la nefrolitiasi nell'uomo è aumentata di circa il 70% negli ultimi vent'anni, e se un tempo era considerata una malattia dell'adulto, si è osservato recentemente un incremento di casi riscontrati nei bambini (Tasian *et al*., 2014).

Nell'urina sono presenti i prodotti terminali del metabolismo proteico in quantità variabile in funzione del ricambio azotato dell'organismo, del quale i principali composti sono l'urea, la creatinina, l'acido ippurico, l'allantoina, le basi puriniche e l'acido urico (Clement, 1998).

Tra i vari tipi di calcoli urinari, quelli costituiti da acido urico e urati assumono una certa importanza sia negli animali sia nell'uomo per la loro eziopatogenesi. L'acido urico è il prodotto terminale del catabolismo delle purine. La via catabolica attraverso la quale i nucleotidi AMP (adenosin-monofosfato) e GMP (guanosin-monofosfato) vengono trasformati in acido urico è illustrata in fig. 1 (Siliprandi e Tettamanti, 2014).

L'acido urico è una molecola poco solubile in acqua in condizioni fisiologiche (pH 7,4 e 37 C°); l'urato circola nel plasma e nel liquido sinoviale in una forma ionica mono-deprotonata. Il plasma si considera saturato dall'urato quando esso raggiunge il suo limite di solubilità, che è approssimativamente di 6,8 mg/dL. Oltre questa concentrazione la soluzione si considera sovrasatura. Nell'intervallo di sovrasaturazione comincia la formazione di cristalli, con un'ulteriore alterazione della solubilità dell'urato, e questo fenomeno si può diffondere a seconda delle condizioni locali (Martillo, 2014). In particolare, sotto forma di cristalli, l'urato si è osservato sia in forma completamente protonata come acido urico, sia in una varietà di sali di urato formati per deprotonazione totale o parziale, il più comune dei quali è il monourato di sodio monoidrato, reperibile più frequentemente nelle articolazioni.

Le cause di iperuricemia sono state molto studiate e variano anche a seconda delle specie considerate. Ad esempio, mentre tutti i mammiferi possiedono la xantina ossidasi, enzima che serve a trasformare la xantina in acido urico (fig.1) (Siliprandi e Tettamanti, 2014), l'uomo e altri primati hanno subito una mutazione genetica per cui non possiedono l'enzima

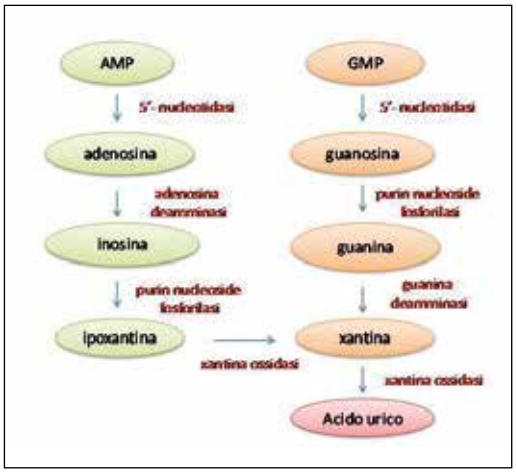
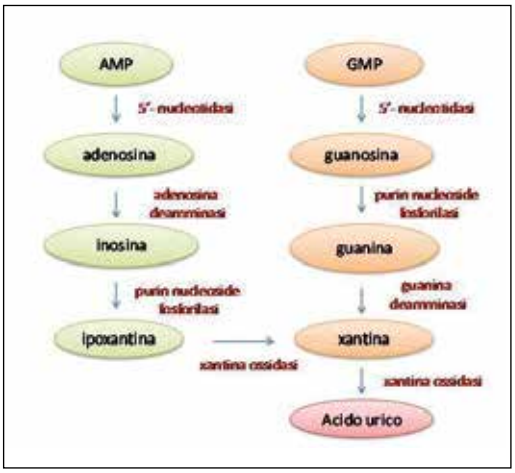


Fig. 1. Catabolismo dei nucleotidi purinici.

Fig. 2. Uricolisi.



uricasi (urato-ossidasi) che serve negli altri mammiferi, nel passaggio catabolico successivo, a trasformare l'acido urico in allantoina (Johnson, 2013; Schett, 2015; Martillo, 2014) (fig. 2) (Urich, 2010). Il rene e l'intestino devono perciò smaltire l'acido urico che continuamente viene accumulato nel corso del catabolismo delle purine, dovuto anche al ricambio tissutale. La perdita dell'attività uricasica potrebbe essere stata un vantaggio nell'evoluzione dell'uomo perché è provato che l'acido urico a livello extracellulare è un potente antiossidante e di conseguenza i suoi più elevati livelli ematici potrebbero contribuire a diminuire il rischio di carcinogenesi che accompagna l'alta longevità degli ominidi (Friedman *et al*., 1985; Wu *et al*.,1989; Oda *et al*., 2002; Choi *et al*., 2005; Urich, 2010).

Altre cause di iperuricemia potrebbero essere: a) una sottoescrezione di urato; b) condizioni di eccessivo ricambio cellulare (p. es. leucemie, anemie emolitiche); c) un'alta introduzione di purine nella dieta (p. es. carne, fegato, reni); d) un'iperattività dell'enzima xantina-ossidasi; e) una diminuita attività di alcuni altri enzimi adibiti al recupero delle basi puriniche che, anziché essere convertite nei rispettivi nucleotidi, vengono trasformate in acido urico (Martillo *et al*., 2014; Siliprandi e Tettamanti, 2014; Schett *et al*., 2015).

Meno del 5% dell'urato presente nel plasma è trasportato legato a proteine ed è liberamente filtrato dal glomerulo renale nei tubuli prossimali, dove viene prevalentemente riassorbito (Martillo *et al*., 2014; Sakhaee *et al*., 2014).

Un'alta concentrazione di acido urico nelle urine, o iperuricosuria, data da uno scarso volume urinario, è uno dei fattori che promuove la formazione di calcoli renali, insieme a una acidificazione del pH. Infatti, mentre nel liquido sinoviale e nel siero il pH viene mantenuto costante, il pH urinario può variare considerevolmente. A un pH inferiore a 5,5, l'urato urinario esiste prevalentemente sotto forma di acido urico, più idrofobico e meno solubile della forma dissociata, quindi la concentrazione della molecola che sarebbe sottosaturata come ione urato viene sovrasaturata nella forma indissociata come acido urico e ne causa la precipitazione sotto forma di cristalli. Per questo l'alcalinizzazione delle urine è uno dei trattamenti d'elezione per la riduzione della calcolosi renale. Inoltre studi in vitro suggeriscono come l'acido urico possa favorire chimicamente la precipitazione di ossalati di calcio (Martillo *et al*., 2014).

Nei reni dei lattanti, ed eccezionalmente in quelli di bambini di età superiore, è possibile talvolta osservare i cosiddetti, in realtà non propriamente definiti, "infarti di acido urico", cioè depositi di urato d'ammonio nei tubuli delle papille renali. Essi sono responsabili in un quadro anatomo-patologico di strie di colore giallo intenso che si dipartono a raggiera dalla pelvi, riconoscibili come birifrangenti se osservate in luce polarizzata. Queste strie chiare, disposte a ventaglio, contrastano nettamente col colorito rosso scuro della midollare (Kauffman, 1961; Piazza e Dalla Palma, 1988; Monga e Mazzucco, 1992) (fig. 3) (Monga e Mazzucco, 1992). E' da sottolineare che questi depositi in genere non comportano un'alterazione della funzionalità renale (Monga e Mazzucco, 1992).

L'eziologia di queste formazioni non è ancora del tutto chiara, ma si pensa possano esse-

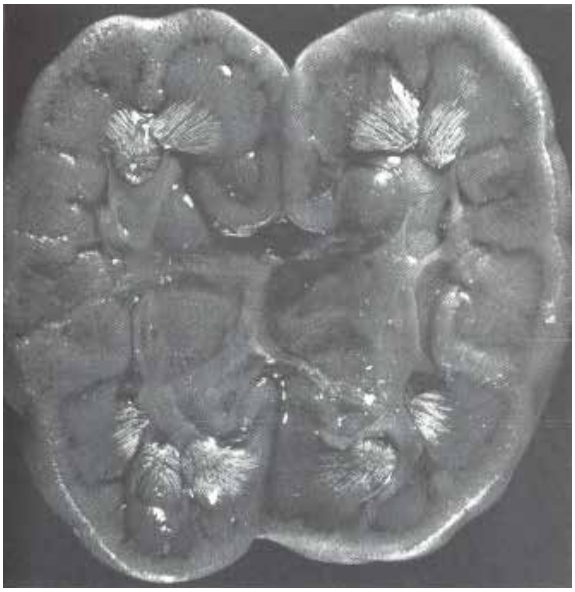


Fig. 3. Bambino lattante, rene: infarti urici (Monga e Mazzucco, 1992)

re dovute alla distruzione nei primi giorni di vita extrauterina di molte cellule appartenenti all'ematopoiesi extramidollare o comunque al sovraccarico di acido urico nel sangue, conseguente ai cambiamenti metabolici che avvengono dopo la nascita (Monga e Mazzucco, 1992).

Secondo alcuni autori è essenziale il fatto che dopo la nascita possa insorgere una notevole distruzione di leucociti, collegata a una leucocitosi presente prima e dopo la nascita, che potrebbe avvenire ad esempio per un prolungamento della durata del parto (Kauffmann, 1961).

Fig. 4. Suinetto lattante, rene: infarti urici.

Fig. 5. Vitello da latte, rene: infarti urici.

Gli infarti di acido urico sembrano comparire quasi esclusivamente nei neonati che sono vissuti e hanno respirato, e la loro eliminazione avviene in genere attraverso l'urina tra il secondo e il ventunesimo giorno di vita. In alcuni casi essi possono permanere più a lungo nei bacinetti o nella vescica come piccoli ammassi giallo-bruni e arrivare alle dimensioni di una lenticchia. Calcoli di urato d'ammonio di maggiori dimensioni sono stati rinvenuti soprattutto nella vescica o nei bacinetti renali di bambini di età superiore (5-7 anni) (Kauffmann, 1961).

Come riscontrato in alcuni reperti anatomo-patologici dagli autori, è interessante che le stesse formazioni costituite da urato d'ammonio possano talvolta comparire in gran parte delle papille renali di suinetti lattonzoli sotto scrofa (fig. 4) e di giovani vitelli da latte (fig. 5). Inoltre nei lattonzoli sarebbe ipotizzabile la loro natura congenita, poiché già osservate in soggetti di pochi giorni di vita (fig. 6).

Da un punto di vista comparativo si può quindi ipotizzare che il suino e il vitello neonati possano rappresentare dei buoni modelli animali per lo studio eziopatogenetico di queste alterazioni metaboliche che avvengono subito dopo la nascita o poco prima del parto, che hanno come conseguenza depositi di urato d'ammonio nei tubuli collettori e nei dotti papillari del rene e che si presentano all'esame macroscopico e microscopico simili a quelle osservate nel bambino lattante.

Fig. 6. Suinetto di 1 giorno, rene: infarti urici congeniti.

Bibliografia

- Choi H.K., Mount D.B., Reginato A.M. Pathogenesis of gout. Ann. Intern. Med. 2005; 143(7): pp. 499-516.
- Clement M.G. Il Rene. In: Fisiologia degli Animali Domestici con Elementi di Etologia. UTET, Seconda Edizione,1998: pp. 589- 653.
- Friedman T.B., Polanco G.E., Appold J.C., Mayle J.E. On the loss of uricolytic activity during primate evolution-I. Silencing of urate oxidase in a hominoid ancestor. Comp. Biochem. Physiol. B. 1985;81(3): pp. 653-659.
- Johnson R.J., Nakagawa T., Jalal D., Sánchez-Lozada L.G., Kang D.H., Ritz E. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which?. Nephrol. Dial. Transplant. 2013 Sep; 28(9): pp. 2221-2228.
- Kaufmann E. Trattato di Anatomia Patologica Speciale. V ed. Italiana diretta da Alfonso Giordano. Vol. II, parte prima. Casa Editrice Dr. Francesco Vallardi, Milano,1959/1961: pp. 731- 733.
- Martillo M.A., Nazzal L., Crittenden D.B. The crystallization of monosodium urate. Curr. Rheumatol. Rep. 2014 Feb;16(2): p. 400.
- Monga G., Mazzucco G. Apparato Urinario. In : Ascenzi A., Mottura G. Trattato di Anatomia Patologica. UTET, IV Ed. Vol. II,1992: p. 957.
- Oda M., Satta Y., Takenaka O., Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. Mol. Biol. Evol. 2002; 19(5): pp. 640-653.
- Piazza M., Dalla Palma P. In: Calì A., Fiore Donati L. Anatomia Patologica. USES, Firenze, 1988: p. 970.
- Sakhaee K. Epidemiology and clinical pathophysiology of uric acid kidney stones. J. Nephrol. 2014 Jun; 27(3): pp. 241-245.
- Sakhaee, K. Uric Acid Metabolism and Uric Acid Stones. In: Rao P.P., Kavanagh J. editors. Urinary Tract Stone Disease. Manchester, UK: Springer; 2011. p. 185-193.
- Schett G., Schauer C., Hoffmann M., Herrmann M. Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout. RMD Open. 2015 Aug 15;1(Suppl. 1).
- Siliprandi N., Tettamanti G. Biochimica Medica. IV edizione. Piccin Nuova Libraria S.p.A., Padova, 2014.
- Tasian G.E., Copelovitch L. Evaluation and medical management of kidney stones in children. J. Urol. 2014; Nov, 192(5):1329-1336.
- Urich K. Comparative Animal Biochemistry. Springer -Verlag Berlin Heidelberg, 2010. Cap.12: pp. 452-453.
- Wu X.W., Lee C.C., Muzny D.M., Caskey C.T. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1989; 86(23): pp. 9412-9416.
- Wu X.W., Muzny D.M., Lee C.C., Caskey C.T. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. J. Mol. Evol. 1992; 34(1):78-84.

2.2
MODELLI DI MALATTIE INFETTIVE

MODELLI ANIMALI DELLE MALATTIE DA PRIONI: IMPORTANZA IN PATOLOGIA COMPARATA

MARIA TERESA CAPUCCHIO, ILARIA BIASATO, ELENA BIASIBETTI

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE) o malattie da prioni sono patologie progressive e degenerative del sistema nervoso centrale, che interessano l'uomo e gli animali, caratterizzate da accumuli di una proteina aggregata in modo anomalo (misfolded) detta proteina prionica o PrPsc. Possono essere spontanee (sporadiche), acquisite (infettive) o ereditarie.

In campo umano tra le malattie da prioni ereditarie (malattie autosomiche dominanti) si annoverano alcune patologie clinicamente molto affini quali: la Creutzfeldt-Jakob-Disease familiare (fCJD), la Gerstmann- Straussler-Scheinker Syndrome (GSS) e l'Insonnia Familiare Fatale (FFI) (Prusiner, 1998). La sintomatologia clinica, l'esordio e il decorso delle malattie dipendono dalla tipologia di mutazione genica che coinvolge il gene codificante la proteina prionica (PrP), anche se è probabile che siano coinvolti altri geni. La forma sporadica di Creutzfeldt-Jakob Disease (sCJD) è la forma più frequente (80% dei casi con incidenza annua di 1-1,5 casi/milione) (Haik e Brandel, 2014). Forme acquisite di Creutzfeldt-Jakob Disease (iCJD) possono essere di origine iatrogena o comunque trasmesse accidentalmente (vCJD). Il Kuru in particolare è stata la prima forma iatrogena identificata da Gajdusek nel 1950 tra le popolazioni della Papua Nuova Guinea che praticavano il cannibalismo. L'origine di questa malattia è a tutt'oggi non chiara, anche se sembra probabile un'esposizione a una fonte di sCJD (Haik e Brandel, 2014).

In campo animale le malattie da prioni descritte sono le seguenti: la scrapie degli ovi-caprini e del muflone, l'Encefalopatia trasmissibile del visone (TME), la Malattia del dimagramento cronico dell'alce e del cervo (CWD), l'Encefalopatia spongiforme bovina (BSE) segnalata nel bovino e in altre specie della famiglia *Bovidae*, e l'Encefalopatia spongiforme del gatto e di altri felidi in cattività (FSE). Sinora solo una di queste forme, la BSE, è considerata una zoonosi.

Le TSE sono caratterizzate da alcuni elementi comuni e precisamente da: agente eziologico non convenzionale altamente resistente, lungo periodo di incubazione (da mesi a decadi), trasmissibilità intra- e interspecifica, tropismo per il sistema nervoso centrale ove si riscontrano lesioni degenerative microscopiche e depositi di strutture proteiche, lenta evoluzione clinica neurologica, esito invariabilmente mortale, assenza di reazioni infiammatorie e immunitarie umorali sinora rilevate, assenza di terapie efficaci per il trattamento.

Gli agenti causali delle TSE sono denominati prioni, ovvero particelle proteiche infettanti altamente resistenti (Prusiner, 1982). Il concetto di infettività di particelle proteiche formulato da Prusiner è stato successivamente supportato da numerose ricerche, tuttavia alcuni suggeriscono che dei cofattori siano necessari per la diffusione e replicazione del prione (Aguilar-Calvo *et al*., 2015). Sono "agenti trasmissibili non convenzionali" poiché sono trasmissibili, dotati di elevata resistenza ai raggi ultravioletti, alle radiazioni, al calore e insolubilità a numerose sostanze chimiche e trattamenti enzimatici. Il prione, indicato come PrP 33-35 (Proteinase resistant Protein dal peso molecolare di 33-35 kDa) detto PrP^{Sc}, è una proteina organizzata in foglietti beta che si accumula in aggregati nel tessuto nervoso dei soggetti malati. Questa proteina patologica deriva da una proteina fisiologica dell'ospite detta PrP^{C}, una sialoglico-

proteina di membrana con elevato mantenimento della sequenza e della struttura terziaria tra i mammiferi (Weissmann, 2004). La PrPc è presente anche nei soggetti sani a livello di membrana plasmatica di numerosi tessuti. La sua funzione non è ben conosciuta, anche se sembra essere coinvolta nei meccanismi di riconoscimento o comunicazione intercellulare (Westergard *et al*., 2007). Le due forme proteiche (PrP^{C} e PrP^{Sc} o isoforma patologica) sono codificate dallo stesso gene, normalmente presente nel genoma di tutti gli animali recettivi; possiedono quindi un'identica sequenza aminoacidica e un numero di aminoacidi variabile da 253 a 264 a seconda della specie. La trasformazione in senso patologico determina la conversione della maggior parte delle alfa eliche costitutive della PrP^{C} in foglietti beta, rendendo la proteina in grado di aggregarsi in fibrille simil-amiloidotiche o SAF (Scrapie Associated Fibrils) e aumentando così la sua resistenza alla digestione enzimatica.

La trasmissibilità rappresenta un aspetto molto importante che accomuna le TSE e che permette la loro riproduzione in specie di laboratorio. Identificata per la prima volta da Gaidusek nel 1957 relativamente al kuru, è stata messa in evidenza nel 1996 e nel 2000 con l'identificazione della trasmissibilità della BSE all'uomo (sviluppo della vCJD) (Bruce *et al*., 1997; Hill *et al*., 1997), sottolineando le estremamente importanti implicazioni di salute pubblica e polizia sanitaria di queste malattie. La trasmissibilità tra individui della stessa specie e tra differenti specie di mammiferi (Kraus *et al*., 2013) permette di indagare le TSE nell'ospite naturale o in modelli di malattia indotti in specie sensibili al di fuori dell'ospite naturale. Questi studi hanno permesso di notare come lo spettro d'ospite sia molto variabile da una malattia all'altra e il meccanismo di trasmissione estremamente complesso, tanto da rendere talvolta molto più semplice utilizzare gli animali transgenici come modello di ricerca. La barriera di specie, strettamente legata al ritardo di sviluppo dei segni clinici e alla percentuale di animali recettivi, è principalmente determinata dalle diverse omologie tra le sequenze prioniche della specie infettante e ospite. In ogni caso l'inoculazione di prioni da una specie a un altra comporta significative differenze dal punto di vista clinico e istopatologico (Carlson *et al*., 1994). Ciò sembra dipendere dal "ceppo" prionico infettante, ovvero dalla conformazione di propagazione tridimensionale che la stessa sequenza di PrP può acquisire in un diverso ospite. La distinzione tra ceppi può essere fatta su linee cellulari di topo transgeniche permettendo di valutare l'affinità ovvero le differenze tra prioni provenienti dai diversi isolati naturali (Fernandez-Borges *et al*., 2015). E' basata sulle differenze biochimiche, il grado di glicosilazione, la resistenza alla proteinasi K, il profilo patologico e la suscettibilità all'infezione di specie di laboratorio (Murdoch e Murdoch, 2015).

Circa l'origine delle TSE animali, varia parzialmente da una patologia all'altra. Alcune forme sono note da tempo, ma non si sa quando e come abbiano avuto origine; ad esempio la scrapie dell'ovino è nota sin dalla fine del '700. Studi più approfonditi sono stati fatti circa l'origine della BSE. Esistono in merito tre ipotesi: si tratterebbe di adattamento al bovino di un ceppo di scrapie (Hill *et al*., 1998) o di "virulentazione" di un agente poco virulento endemico da tempo nella popolazione bovina (Torres *et al*., 2013) o di trasmissione al bovino della CJD umana (Colchester e Colchester, 2005). La somministrazione ai bovini di farine di carne prodotte con carcasse di altri animali morti e la modificazione delle tecniche di produzione (riduzione delle temperature e tempo di trattamento e minor uso dei solventi idrocarburici per l'estrazione dei grassi) verificatasi nel Regno Unito intorno agli anni '80 del secolo scorso avrebbe permesso la sopravvivenza dell'agente e la sua diffusione.

Relativamente ai meccanismi patogenetici, pare che a seguito dell'infezione (via orale in particolare), si verifichi un lungo periodo di eclissi, durante il quale non è rilevabile infettività in alcun tessuto. Ciò lascia presumere l'esistenza di serbatoi dell'infezione ove l'agente replica. I tessuti linfo-reticolari quali tonsille, milza, linfonodi e in caso di contagio per via orale, tessuto linfoide annesso all'intestino (placche del Peyer) sembrano essere la prima sede di replicazione.

La neuroinvasione è una fase critica. Comunque è probabile che avvenga la migrazione tra-

mite i nervi periferici coinvolgendo sia fibre del simpatico sia fibre parasimpatiche (nervo vago). L'agente infettante comunque dopo un lungo periodo di incubazione raggiunge il sistema nervoso centrale ove provoca le caratteristiche e ben note lesioni spongiformi degenerative. Una diffusione periferica dell'agente prionico sembra poi probabile si verifichi nuovamente nelle ultime fasi della malattia sempre per via nervosa (Balkema-Buschmann *et al*., 2011). Il meccanismo di neurotossicità con cui i prioni causano neurodegenerazione non è ancora ben noto. E' innegabile una diretta neurotossicità da parte della PrPsc (Sandberg *et al*., 2011), ma è probabile un diretto coinvolgimento anche della PrPc, tanto che in topi PrPknock-out non si osserva danno neuronale (Bueler *et al*., 1993). Un recente meccanismo proposto da Halliday *et al*. (2014) parla di alterazione del meccanismo di proteostasi (UPR-Unfolded Protein Response) ovvero di un meccanismo cellulare protettivo dagli stress che mantiene l'omeostasi proteica: manipolando geneticamente e farmacologicamente questo meccanismo si impedisce la replicazione prionica evitando l'induzione di neurotossicità.

Al momento, l'unica diagnosi certa di TSE può essere fatta dopo la morte dell'animale mediante test immunoenzimatici seguiti dall'esame istopatologico dell'encefalo e da prove immunologiche (indagini immunoistochimiche e western-blot) (Murdoch e Murdoch, 2015). Le lesioni istologiche sono molto simili in tutte le malattie da prioni; le principali differenze sono date dalla loro distribuzione nel sistema nervoso centrale e dalla presenza variabile di accumuli di PrPsc.

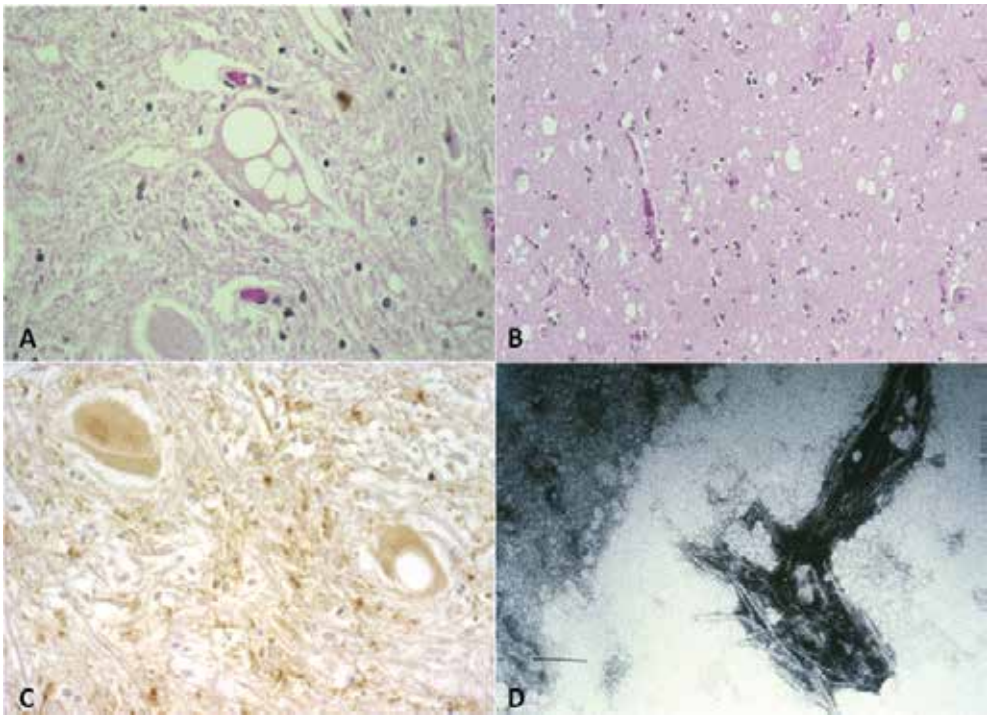


Fig. 1. A. Bovino. Encefalo. Vacuolizzazioni multiple neuronali (colorazione Ematossilina-Eosina, 400x). B. Bovino. Encefalo. Vacuolizzazioni multiple nei prolungamenti neuronali - neuropilo. (colorazione Ematossilina-Eosina, 100x). C. Bovino. Encefalo. Accumuli di PrPSc evidenziati mediante tecnica immunistochimica (400x). D. Ovino. Omogenato di tessuto nervoso. Fibrille - SAF osservate al microscopio elettronico a trasmissione.

Il quadro istopatologico è caratterizzato dalla presenza di vacuolizzazioni uniche o multiple dei pericari neuronali (fig. 1A) e dei loro prolungamenti (spongiosi del neuropilo) (fig. 1B), degenerazione e perdita neuronale, astrocitosi/astrogliosi e presenza di placche amiloidi ovvero accumuli più o meno organizzati intracellulari di PrPsc (Davis *et al*., 1991). La vacuolizzazione del neuropilo prevale nella sostanza grigia ed è solitamente bilaterale e simmetrica. Si tratta di vacuoli di diametro abbastanza uniforme, ben delineati e apparentemente vuoti. La loro localizzazione neuroanatomica varia a seconda della specie animale e del ceppo dell'agente infettante. Nella BSE prevale nel tronco encefalico caudale (nucleo del tratto solitario, nucleo parasimpatico del vago e nucleo del trigemino nel bulbo e nuclei vestibolari del ponte) (Jeffrey e Gonzales, 2004). Nella scrapie la localizzazione è molto variabile ed è strettamente legata al ceppo. Nella FSE è sempre presente a livello di nucleo caudato, ma la si trova anche nel talamo, nella corteccia cerebrale e nel tronco encefalico. I vacuoli neuronali possono variare in diametro e numero e sono solitamente vuoti, benché siano stati descritti occasionali granuli o inclusioni amorfe al loro interno. Anche tali vacuoli hanno siti di predilezione, in particolare comunque si riscontrano nei neuroni del tronco encefalico (scrapie, BSE, FSE). La degenerazione neuronale è di grado variabile e probabilmente dipende dalla durata dei segni clinici. L'astrocitosi è tipica delle aree poste perifericamente alle lesioni spongiformi. E' comunque di grado variabile a seconda della TSE; nella BSE per esempio è solitamente molto modesta, mentre nella scrapie può essere molto imponente anche in aree senza alcun'altra lesione. E' facilmente evidenziabile solo con tecniche immunoistochimiche quali in particolare quelle specifiche per la GFAP o glicoproteina acida fibrillare con localizzazione elettiva a livello astrocitario. Gli accumuli di PrPsc sono un reperto di entità variabile. Si riscontrano abbondanti nelle TSE dell'uomo e nella scrapie, mentre sono molto rari nella BSE. Non si evidenziano su sezioni colorate con Ematossilina-Eosina, ma richiedono l'utilizzo di tecniche istochimiche quali il Rosso Congo o meglio ancora immunoistochimica specifica con l'impiego di anticorpi diretti verso la PrPsc. La conferma della diagnosi istologica si ottiene con le indagini immunoistochimiche al fine di evidenziare gli accumuli di PrPSc nelle sezioni istologiche (fig. 1C), il western-blot o la ricerca delle SAF al microscopio elettronico. Il western-blot avviene a partire da materiale cerebrale fresco o congelato. La presenza della PrPsc nel campione in esame comporta la comparsa di bande abbastanza ben distinguibili con un peso molecolare compreso tra 20 e 30 kDa circa. L'identificazione delle SAF (fig. 1D) richiede la loro estrazione e purificazione partendo da una sospensione di tessuto nervoso (encefalo o midollo spinale) fresco e richiede l'osservazione con il microscopio elettronico a trasmissione.

Encefalopatie spongiformi animali

La scrapie è una patologia nota nelle pecore da oltre 200 anni (Parry, 1983), cosmopolita, endemica in molti Paesi del mondo e caratterizzata da depositi di PrPsc non solo nel tessuto nervoso, ma anche in altri distretti tra cui in particolare gli organi linfoidi, la placenta, la ghiandola mammaria e l'intestino (Aguilar-Calvo *et al*., 2015). Si trasmette per via verticale e orizzontale. Attualmente si conoscono diversi fenotipi di questa patologia associati a diversi ceppi infettanti, tra cui una forma atipica (Nor98) identificata nel 1998 in Norvegia (Benestad *et al*., 2003) che sembra aver avuto origine spontanea. Lo sviluppo della scrapie è fortemente dipendente dal genotipo PrP dell'ospite e dal ceppo infettante. Negli ovini sono attivi dei programmi di selezione genetica al fine di promuovere all'interno delle greggi l'allevamento di genotipi resistenti. Analoghi piani di selezione non sono attivi per i caprini, anche se si conoscono diversi polimorfismi legati a maggiore suscettibilità o resistenza (Aguilar-Calvo *et al*., 2015). Al momento non ci sono evidenze a supporto della trasmissibilità della scrapie all'uomo, nonostante il potenziale zoonosico non sia stato del tutto escluso (Cassard *et al*., 2014).

La BSE è stata identificata per la prima volta nel bovino nel 1986 (Wells *et al*., 1987) e successivamente è stata descritta in quasi tutti i Paesi europei e in alcuni Paesi extra-europei (Brasile, Canada, FaIkland, Giappone, Oman, Stati Uniti - http://www.oie.int). In Italia la prima segnalazione in animali importati risale al 1994 (Guarda *et al*.,1994), il primo caso autoctono è del 2001. Dopo un aumento progressivo dei casi fino a raggiungere un massimo intorno agli anni '90 del secolo scorso, le misure di profilassi imposte dalla comunità europea hanno permesso la netta diminuzione del numero dei capi infetti e attualmente il trend è in netto calo. La trasmissione naturale della BSE è prevalentemente orale. Sono colpiti in genere gli animali adulti di 3-6 anni senza particolari predisposizioni di razza o sesso. Le lesioni sono confinate al sistema nervoso centrale, ma accumuli di PrPsc di lieve entità sono stati osservati anche nelle placche del Peyer, nell'intestino e nelle tonsille (Aguilar-Calvo *et al*., 2015). L'agente prionico della BSE ha dimostrato ampia capacità di superare la barriera di specie essendo stato trasmesso all'uomo (nvCJD) (Hill *et al*., 1997), ai gatti, a molti felidi e ruminanti in cattività. Sperimentalmente è stata trasmessa a molte specie inclusi pecore, capre e primati non umani (Aguilar-Calvo *et al*., 2015). Si conoscono due varianti atipiche denominate H-type (Biacabe *et al*., 2004) e L-type (Casalone *et al*., 2004) descritte in animali vecchi (oltre 10 anni) con caratteristiche biochimiche e istologiche diverse dalla forma classica. Hanno però bassa prevalenza e per questo si considerano di origine sporadica.

L'encefalopatia spongiforme dei felidi è stata descritta per la prima volta nel 1990 nel Regno Unito (Aldhous, 1990). La sua origine resta sconosciuta anche se sembra correlata all'impiego di cibi contaminati con carcasse infette da BSE.

L'Encefalopatia trasmissibile del visone (TME) è una rara malattia trasmessa orizzontalmente tra i visoni con il cannibalismo. La sua origine resta sconosciuta, anche se è probabile sia stata trasmessa tramite assunzione di alimenti contaminati con tessuti di bovini infetti (Marsh e Hartsough, 1988; Aguilar-Calvo *et al*., 2015).

La Malattia del dimagramento cronico dell'alce e del cervo (CWD) è una malattia neurodegenerativa limitata a queste specie, la cui origine resta ignota anche se verosimilmente correlata alla scrapie, riportata negli USA. E' trasmessa orizzontalmente, ma forse anche per via verticale; non è in grado di essere trasmessa ad altre specie per via orale. I dati sul rischio zoonosico sono sconosciuti (Aguilar-Calvo *et al*., 2015). Recentemente ha fatto la sua comparsa anche in Europa (Norvegia) (Benestad *et al*., 2016) tuttavia è totalmente sconosciuta la sua potenziale presenza nei cervidi europei.

I rischi di salute pubblica legati alle TSE sono legati essenzialmente alla BSE, l'unica forma di cui è riconosciuto il rischio zoonosico. Recentemente si sono ridotti per la minor incidenza della BSE grazie alle misure cautelative messe in atto dai diversi Paesi europei basate sul divieto di utilizzo delle farine di carne nell'alimentazione animale e sul sequestro degli "specific risk material" (SRM: encefalo, midollo spinale, gangli spinali, intestino e tonsille nel bovino) potenzialmente infetti dalla catena alimentare, tuttavia l'attenzione resta alta per l'identificazione di forme atipiche di BSE nel bovino e scrapie negli ovini di cui non si conosce appieno l'origine e la trasmissibilità interspecie. Dal 2001 le misure di sorveglianza sulla BSE si sono divise in misure passive (denuncia dei casi clinici) e attive, utilizzando dei test rapidi sui bovini regolarmente macellati di età avanzata, su tutti gli animali trovati morti in allevamento, macellati d'urgenza e che avessero consumato mangimi con farine animali. Dal 1 luglio 2013, il Ministero della Salute italiano, in riferimento alla Decisione 2013/76/UE, ha sospeso i test per la BSE sui bovini regolarmente macellati sani. Continuano a essere sottoposti a controllo sistematico tutti i bovini di età superiore ai 48 mesi che presentano segni clinici sospetti di malattia, morti, macellati d'urgenza o differiti.

I test rapidi attualmente disponibili sono diversi (ELISA o western-blot modificati), comunque tutti consentono di rilevare la proteina PrPsc nel tessuto encefalico più rapidamente rispetto

alle metodiche istologiche classiche (48 ore), ma non più precocemente. Si eseguono a partire da tronco encefalico caudale che viene prelevato in sede di macellazione con apposito "cucchiaio" monouso. In caso di test positivo o inconclusivo il risultato deve comunque essere confermato mediante istopatologia, immunoistochimica e western-blot.

Conclusioni

Le forti somiglianze tra le malattie dell'uomo e le forme animali offrono grandi vantaggi alla ricerca biomedica. In particolare se nell'uomo spesso la diagnosi è molto tardiva tanto da rendere impossibile ogni approccio terapeutico, le malattie degli animali sono state molto studiate tanto da conoscerne spesso il periodo di incubazione, la progressione clinica e i genotipi sensibili permettendo pertanto di essere usati in studi prospettici dal punto di vista profilattico e terapeutico.

Purtroppo le informazioni mancanti sulle TSE sono però ancora tante, a partire dall'agente causale, una proteina la cui funzione reale resta ignota, alle modalità di trasmissione, alla patogenesi. Ciò rende al momento indisponibili test diagnostici utilizzabili in fase pre-clinica o durante le fasi precoci della malattia. Altrettante lacune rendono impossibile un approccio terapeutico. Molti restano pertanto gli interrogativi a cui rispondere nell'immediato futuro tra cui in particolare realizzare delle procedure diagnostiche tali da permettere una diagnosi sempre più precoce aumentando la sensibilità dei test al fine di rilevare quantità sempre minori di PrPsc, rilevare tale proteina in tessuti diversi dal SNC e fare uso di marker indiretti dell'infezione.

Bibliografia

- Aguilar-Calvo P., García C., Espinosa J.C., Andreoletti O., Torres J.M. Prion and prion-like diseases in animals. Virus Research 207: 82–93, 2015
- Aldhous, P.BSE: spongiform encephalopathy found in cat. Nature 345 (6272),194. 1990
- Balkema-Buschmanna A., Fast C., Kaatz M., Eiden M., Ziegler U., McIntyre L., Keller M., Hills B., Groschup M.H. Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. Preventive Veterinary Medicine 102: 112– 117, 2011
- Benestad SL, Mitchell G, Simmons M, Ytrehus B, Vikøren T. First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. Vet Res.15;47(1):88, 2016
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98.Vet Rec. 153(7):202-8, 2003.
- Biacabe A.G., Laplanche J.L., Ryder S., Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. EMBO Rep. 5 (1), 110–115, 2004
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmission to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. Nature.389:498–501, 1997.
- Büeler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M., Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell 73, 1339–1347, 1993.
- Carlson G.A., Ebeling C., Yang S.L., Telling G.C., Torchia M., Groth D., Westaway D.,DeArmond S.J., Prusiner S.B. Prion isolate specified allotypic interactionsbetween the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice.Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 5690–5694, 1994.
- Casalone C., Zanusso G., Acutis P., Ferrari S., Capucci L., Tagliavini F., Monaco S., Caramelli M. Identification of a second bovine amyloidotic spongi-form encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt–Jakobdisease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (9), 3065–3070, 2004.
- Cassard H., Torres J.M., Lacroux C., Douet J.Y., Benestad S.L., Lantier F., Lugan S., Lantier I., Costes P., Aron N., Reine F., Herzog L., Espinosa J.C., Beringue V., Andréoletti O. Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. Nat Commun. 5:5821, 2014.
- Colchester A.C., Colchester N.T. The origin of bovine spongiform encephalo-pathy: the human prion disease hypothesis. Lancet 366 (9488), 856–861, 2005.
- Davis AJ, Jenny AL, Miller LD. Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy. J Vet Diagn Invest. 3:266–71, 1991.
- Fernández-Borges N., Erana H., Venegas V., Elezgarai S.R., Harrathi C., Castilla J. Animal models for prion-like diseases. Virus Research 207: 5–24, 2015
- Guarda F., Castiglione F., Agrimi U., Cardone F., Caracappa S., Pocchiari M. Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) in Italia. Il Progresso Veterinario. 11: 675-678, 1994.
- Haïk S.,Brandel J.P. Infectious prion diseases in humans: Cannibalism, iatrogenicity and zoonoses. Infection, Genetics and Evolution 26: 303–312, 2014.
- Halliday M., Radford H., Mallucci G.R. Prions: generation and spread versusneurotoxicity. J. Biol. Chem. 289 (29), 19862–19868, 2014.
- Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C., Gowland I., Collinge J., Doey L.J.,Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. Nature 389 (6650),448–450, 526, 1997.
- Hill A.F., Sidle K.C., Joiner S., Keyes P., Martin T.C., Dawson M., Collinge J. Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. Neurosci.Lett. 255 (3), 159–162, 1998.
- Kraus A., Groveman B.R., Caughey B. Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. Annu. Rev. Microbiol. 67, 543–564, 2013.

– Jeffrey M., Gonzalez L. Pathology and pathogenesis of bovine spongiformencephalopathy and scrapie. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 284, 65–97, 2004.
– Marsh RF, Hartsough G. R. Evidence that Transmissible Mink Encephalopathy Results from feeding infected cattle. Proceedings of the 4th International Scientific Congress in Fur Animal Production; August 21–28, 1988. Toronto, Canada.
– Murdoch B.M. and Murdoch G.K. Genetics of Prion Disease in Cattle. Bioinformatics and Biology Insights 9(S4), 2015.
– Sandberg M.K., Al-Doujaily H., Sharps B., Clarke A.R., Collinge J. Prion prop-agation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. Nature470 (7335), 540–542, 2011.
– Torres J.M., Castilla J., Pintado B., Gutierrez-Adan A., Andreoletti O., Aguilar-Calvo P., Arroba A.I., Parra-Arrondo B., Ferrer I., Manzanares J., Espinosa J.C. Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice. Emerg.Infect. Dis. 19 (12), 1938–1947, 2013.
– Parry H. B. Scrapie Disease in Sheep. Ed D. R. Oppenheimer. London, Academic Press. p 31, 1983
– Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A. 23:13363–83, 1998.
– Prusiner S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216, 136–144, 1982.
– Weissmann C.The state of the prion. Nat. Rev. Microbiol. 2, 861–871, 2004.
– Wells G.A., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. Vet. Rec. 121 (18), 419–420, 1987.
– Westergard L, Christensen HM, Harris DA. The cellular prion protein (PrPC): its physiological function and role in disease. Biochim Biophys Acta. 1772(6):629–44, 2007.
– http://www.oie.int - 3 ottobre 2016

RETROVIROSI DEGLI ANIMALI E DELL'UOMO: ASPETTI DI PATOLOGIA COMPARATA

ENRICO BOLLO, FRINE ELEONORA SCAGLIONE

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Il virus dell'immunodeficienza felina (FIV – Feline Immunodeficiency Virus) è strettamente correlato, da un punto di vista filogenetico, al virus dell'immunodeficienza dell'uomo (HIV – Human Immunodeficiency Virus), e presenta numerose caratteristiche simili in termini di biologia, patogenesi ed evoluzione clinica. Pertanto può essere un utile modello per lo studio dell'AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome – sindrome da immunodeficienza acquista) dell'uomo.

I vertebrati ospitano numerosi retrovirus appartenenti alla famiglia dei Lentivirus. Questi ultimi sono un gruppo di virus che infettano le cellule in fase non replicativa, inducendo una malattia progressiva, a esito altamente letale. Soltanto alcuni retrovirus presentano un tropismo per i linfociti: in tal senso gli unici retrovirus a indurre immunodeficienza sono quelli dei primati e dei felidi (HIV – Human Immunodeficiency Virus; SIV - Simian Immunodeficiency Virus; e FIV – Feline Immunodeficiency Virus), rispetto ai lentivirus degli ungulati che presentano per la maggior parte un tropismo per i macrofagi.

La scoperta di HIV come il responsabile di immunodeficienza acquisita nell'uomo, e della conseguente epidemia globale ad alta mortalità e morbilità, ha stimolato la ricerca sulle interazioni ospite-lentivirus in alcune specie di mammiferi, anche alla luce della capacità dei retrovirus di superare le barriere di specie. E' infatti stata chiaramente appurata la trasmissione di SIV (e in particolare della variante SIVcpz, di origine dallo scimpanzè) dalle scimmie all'uomo, con conseguente insorgenza dell'epidemia di HIV a partire dagli anni '80 del secolo scorso (Sharp e Hahn, 2011). Tuttavia indagini successive hanno dimostrato come trasmissioni iniziali di SIVcpz agli esseri umani si siano già verificate poco più di 100 anni fa, e hanno altresì rivelato successive trasmissioni multiple indipendenti, come dimostrato dalla presenza di sottogruppi di HIV-1 maggiormente simili a SIVcpz (Hahn *et al*., 2000). Analogamente, il ceppo HIV-2 in Africa occidentale (dove provoca una malattia meno diffusa e di minor gravità) è derivato dalla trasmissione all'uomo di un ceppo di SIV (SIVsm) dal Cercocebo moro (*Cercocebus atys*).

SIVcpz è stato trasmesso anche al gorilla, ma la patogenicità in questa specie è poco nota (Takehisa *et al*., 2009; Peeters e Delaporte, 2012). Mentre i meccanismi d'insorgenza della malattia a seguito della trasmissione a una nuova specie sono per ora poco studiati, la filogenesi virale e l'evoluzione dell'epidemia di HIV sono invece già ben compresi.

I gatti domestici possono essere infettati dal virus dell'immunodeficienza felina (FIV). Tale virus colpisce elettivamente la sottopopolazione dei linfociti CD4, inducendo una linfopenia simile a quella che si osserva negli esseri umani infettati da HIV.

Recentemente è stata dimostrata la presenza di FIV anche in felidi non domestici (O'Brien *et al*., 2012). Per quanto riguarda la presenza di FIV nelle popolazioni di felidi, è stato appurato che nei gatti domestici il virus è presente da almeno 10-20.000 anni, mentre nei felidi non domestici (e in particolare nel leone) da molto più tempo (Pecon-Slattery *et al*., 2008; Troyer *et al*., 2008). Studi compiuti sul puma o coguaro (*Puma concolor*) in Nord America hanno evidenziato la presenza di ceppi di FIV, con elevati tassi di infezione, ma senza conseguenze gravi sulla fecondità, la sopravvivenza e l'immunocompetenza di questa specie. Nei leoni africani sono stati

descritti due sottotipi di FIV Panthera leo (FIVple), B ed E, di cui il sottotipo E è più simile al ceppo FIV B del gatto domestico (McEwan *et al*., 2008), inoltre sia FIVple E sia FIV del gatto domestico si legano ai recettori CD134 e CXCR4 dei linfociti CD4.

Analogamente a quanto avviene nell'uomo infetto da HIV, anche nei gatti domestici infetti da FIV le infezioni opportunistiche con virus, batteri, funghi e protozoi sono frequenti (Hartmann, 2012), così come le alterazioni subcliniche del sistema immunitario, quali iperglobulinemia e neutropenia (Ackley *et al*., 1990; Sprague *et al*, 2010), elevata incidenza di tumori (linfomi maligni), lesioni neurologiche, stomatiti e nefropatie (Hofmann-Lehmann *et al*., 1998; Gabor *et al*., 2001; Poli *et al*., 2012).

Per quanto riguarda gli aspetti epidemiologici dell'infezione da FIV nei gatti domestici, si è rilevato che popolazioni di gatti castrati, che risiedono normalmente in appartamento e con cure mediche regolari, presentano una prevalenza d'infezione inferiore al 5% (Lee *et al*., 2002; Chhetri *et al*., 2013), mentre nelle popolazioni di gatti interi e di gatti selvatici la prevalenza dell'infezione è spesso superiore al 20% (Teixeira *et al*., 2012; Bande *et al*., 2012).

Per FIV, così come per HIV, sono state identificate cladi virali diverse con dominanza in determinate aree geografiche. Queste cladi sono identificate da A a F in base alla sequenza delle variazioni nelle regioni ipervariabili del gene *env*, con una maggiore diffusione dei gruppi A e B (Weaver, 2010), sebbene si osservi una regolare comparsa di ceppi ricombinanti di diverse cladi (Reggeti e Bienzle, 2004).

Nonostante una sostanziale divergenza a livello nucleotidico, il genoma di FIV è molto simile a quello di HIV, con caratteristiche di replicazione del genoma identiche a quelle di altri lentivirus (Elder *et al*., 2010).

In particolare FIV non possiede i geni equivalenti a *vpr*, *vpu* e *nef* di HIV, e non è in grado di codificare per una proteina transattivante come Tat. Tuttavia FIV possiede un gene accessorio *Orfa* (o *ORF2*), con funzione di legarsi al recettore cellulare CD134 (Hong *et al*., 2010) e di promuovere la replicazione nelle cellule mononucleate del sangue (Celestino *et al*., 2012).

Analogamente ad HIV, FIV possiede proteasi, trascrittasi inversa e integrasi (enzimi essenziali per la replicazione virale), il gene *pol* (che codifica per la desossiuridinafosfatasi) (Lerner *et al*., 1995), nonché la proteina Gag (necessaria per la formazione di particelle virali e il loro rilascio).

Sia FIV sia HIV infettano prevalentemente linfociti T CD4, con modalità simili (ancorché non uguali): FIV utilizza CD134 come recettore primario, inducendo una modificazione conformazionale del virus che ne permette la successiva interazione con CXCR4 e l'ingresso nelle cellule (Shimojima *et al*., 2004; de Parseval *et al*., 2004). Analogamente, HIV dapprima si lega ai linfociti CD4, e successivamente interagisce con CCR5 o CXCR4 per poter penetrare nelle cellule (Yang *et al*., 2012). I successivi passaggi nel corso dell'infezione utilizzano, per entrambi i virus, le interazioni con i recettori precedentemente attivati dei linfociti T CD4, a seguito dell'attivazione di CD134 e CCR5. Sia nel corso dell'infezione da FIV che da HIV, i linfociti che non esprimono CD4 (linfociti CD8 e linfociti B), i macrofagi e le cellule dendritiche (che presentano bassi livelli di CD134), possono essere infettati da FIV, tuttavia l'integrazione virale è assai più bassa che nei linfociti CD4 (Reggeti *et al*., 2008).

FIV può essere trasmesso attraverso la placenta, l'epitelio intestinale nei neonati, l'epitelio vaginale, ed è in grado di superare la barriera emato-encefalica infettando il sistema nervoso centrale (Howard *et al*., 2010; Miller *et al*., 2011; Meeker *et al*., 2012; Stoeker *et al*., 2013), analogamente a quanto accade durante l'infezione da HIV nell'uomo; infatti sono stati rilevati mRNA di CD134 e di CXCR4 nel tessuto placentare, sul trofoblasto e in astrociti felini (Nakagaki *et al*., 2001; Scott *et al*., 2008; Scott *et al*., 2011). E' quindi evidente come il modello d'infezione da FIV nel gatto offre importanti opportunità per lo studio delle interazioni tra virus e cellula in diversi comparti tissutali.

La risposta immunitaria di gatti sperimentalmente infettati con FIV è molto simile a quella di pazienti umani affetti da HIV. La risposta immunitaria innata viene attivata entro alcuni minuti o poche ore nel punto di penetrazione del virus. Mentre l'infezione da FIV si verifica solitamente attraverso l'inoculazione diretta di sangue attraverso morsi (soprattutto durante i combattimenti tra gatti interi nel corso dei corteggiamenti sessuali o durante l'accoppiamento), HIV è invece più comunemente trasmesso attraverso le mucose; ciò fa sì che le risposte innate siano attivate più rapidamente nel corso dell'infezione da FIV.

I linfociti natural killer (NK), che normalmente si attivano nel corso d'infezione da agenti patogeni nel quadro della risposta innata, nei gatti infetti da FIV hanno dimostrato una funzione ridotta (Dean *et al*., 2006; Simões *et al*., 2012).

La risposta immunitaria innata in corso d'infezione da HIV è stata studiata solo recentemente in modo approfondito rispetto ad altri aspetti dell'infezione. Molti meccanismi della risposta innata sono inattivi nell'infezione da HIV rispetto ad altre infezioni virali, presumibilmente a causa dell'integrazione di geni retrovirali nel genoma dei mammiferi (compreso l'uomo) nel corso dell'evoluzione, con conseguenti adattamenti e silenziamento di geni (Iwasaki, 2012). Tuttavia restano ancora molti aspetti da esplorare della risposta immunitaria innata nell'uomo in paragone con quanto accade nel gatto, soprattutto alla luce del fatto che anche i gatti presentano un'ampia integrazione nel proprio genoma di retrovirus (soprattutto di origine murina).

I fattori di restrizione antivirali innati dell'ospite sono rappresentati da APOBEC3, TRIM-5-alfa e teterina (Zielonka e Münk, 2011). Ogni fattore di restrizione interferisce con una diversa fase del ciclo di replicazione del virus. Si ritiene inoltre che possano costituire un ostacolo importante nella trasmissione inter-specifica. APOBEC3 è un gruppo di enzimi citoplasmatici che interferiscono con la trascrizione inversa, inducendo mutazioni nel filamento negativo del genoma sia di HIV che di FIV, riducendo quindi l'integrazione virale. E' stato rilevato che i gatti possiedono un minor numero di geni che codificano per APOBEC3 rispetto all'uomo (Zielonka e Münk, 2011).

TRIM5 nei primati si lega al capside virale tramite un dominio nel terminale C, determinando la degradazione del proteasoma. Questa interazione è un potente meccanismo di antivirale nei primati, ma nei gatti il terminale C di TRIM5 alfa è assente a causa di una mutazione che tronca la proteina, eliminando quindi la sua funzione antivirale (McEwan *et al*., 2009).

La teterina infine riduce il rilascio di virioni provvisti di involucro, sia per HIV sia per FIV (Dietrich *et al*., 2011).

La risposta immunitaria adattativa all'infezione sperimentale con FIV nei gatti è molto simile a quella che si osserva nell'uomo con infezione da HIV (Harari e Pantaleo, 2008). Linfociti citotossici (CTL) virus-specifici e anticorpi compaiono entro le 2-4 settimane dall'infezione, che è il periodo coincidente con riduzione della viremia plasmatica (Tompkins e Tompkins, 2008).

In base agli studi finora condotti, è probabile che i CTL nei gatti infetti da FIV (così come nei pazienti umani infetti da HIV) servano principalmente per ridurre la replicazione virale durante la fase clinicamente silente dell'infezione, e quindi rallentare la progressione della malattia. Tuttavia, i CTL sia nel gatto sia nell'uomo non sono in grado di eliminare il virus a causa della mancanza di produzione di quantità sufficienti di citochine da parte delle cellule CD4, e/o per la comparsa di mutanti virali (Coffin e Swanstrom, 2013).

In gatti infetti da FIV così come in pazienti umani infetti da HIV sono stati evidenziati linfociti T CD8 in grado di sopprimere la replicazione virale (Li *et al*, 2005; Tompkins e Tompkins, 2008; McDermott e Koup, 2012), che vengono prodotti a seguito di una riduzione della viremia plasmatica e contribuiscono alla linfocitosi CD8-associata, con inversione del rapporto CD4/CD8 durante la fase clinicamente silente dell'infezione (Tompkins *et al*.,

2002). Inoltre è stata dimostrata la capacità dei linfociti CD8 di produrre citochine (IL-2 e IFN-gamma) e chemochine (CCL3 e CCL4), responsabili dell'inibizione di HIV e FIV (Li *et al*, 2005; Saunders *et al*, 2011)

La perdita di linfociti T CD4 (principale conseguenza dell'infezione sia da HIV sia da FIV) come risultato di citolisi virale, citolisi immunitaria, apoptosi e anergia, determina in entrambe le specie una condizione di immunodeficienza (McDermott e Koup, 2012; Walker e McMichael, 2012; Coffin e Swanstrom, 2013). In entrambe le specie (uomo e gatto) numerosi studi suggeriscono che durante l'infezione acuta non vi sia attivazione diffusa dei linfociti T CD4, con conseguente indisponibilità di cellule suscettibili all'infezione virale (Walker e McMichael, 2012), tuttavia la replicazione di HIV e di FIV continua a livelli bassi, nonostante l'utilizzo (nell'uomo) di terapie antivirali, presumibilmente in cellule della memoria (linfociti) a lunga vita, o in macrofagi (Coffin e Swanstrom, 2013).

La comprensione della replicazione virale, della risposta immunitaria dell'ospite e delle sue caratteristiche genetiche nel corso delle infezioni da lentivirus è molto più limitata nei gatti che nell'uomo. Tuttavia, alcuni aspetti della risposta immunitaria cellulare in corso d'infezione da FIV sono stati ben descritti, e generalmente corrispondono a quelli osservati nell'infezione da HIV. L'applicazione di test per la rilevazione di RNA virale plasmatico ha indicato che le dinamiche virali seguono un decorso simile in gatti infetti da FIV e in pazienti infetti da HIV (Walker e McMichael, 2012; Miller *et al*., 2013).

Un'efficace immunità umorale è utile per prevenire l'infezione o per contenere la diffusione dell'infezione dopo esposizione al virus. Nel corso dell'infezione da HIV è stata identificata solo una limitata batteria di anticorpi in grado di neutralizzare una vasta gamma di ceppi virali, mentre invece la maggior parte degli anticorpi prodotti è inefficace nel neutralizzare il virus (Harari e Pantaleo, 2008). Nell'infezione da FIV, gli anticorpi sono generati in grande quantità nel giro di poche settimane di esposizione e persistono per tutta la vita dell'animale. Pertanto la determinazione degli anticorpi anti-FIV mediante test di laboratorio o ambulatoriali è alla base della diagnosi di FIV nel gatto.

L'utilizzo di test per valutare le risposte umorali in gatti sperimentalmente infetti ha dimostrato che la risposta anticorpale neutralizzante è piuttosto debole e di lenta insorgenza (Kraase *et al*., 2010). FIV, come HIV, accumula rapidamente mutazioni della proteina Env, rappresentate da sostituzioni aminoacidiche, variazioni di lunghezza e di glicosilazione, che servono per nascondere o alterare epitopi accessibili agli anticorpi.

Al momento, la comprensione dettagliata della risposta anticorpale all'infezione da FIV è incompleta, e gli anticorpi neutralizzanti, la componente più promettente della protezione immunitaria, devono ancora essere completamente caratterizzati.

Non esiste un'immunità protettiva e persistente presente in natura che protegga dall'infezione da HIV (McCarthy, 2013). La valutazione della possibilità di ottenere una protezione immunitaria per HIV in condizioni reali di trasmissione virale è un obiettivo eticamente impegnativo ed estremamente costoso; in questo senso il modello FIV offre preziose opportunità per la ricerca comparata. Come per HIV, sono stati effettuati molti approcci alla progettazione di vaccini contro FIV, tra cui un vaccino a virus intero inattivato, uno basato su cellule infette, uno ricombinante, uno basato su vettori, e vaccini a base di DNA, con un'ampia gamma di coadiuvanti e con diversi protocolli di somministrazione (Yamamoto *et al*., 2010).

La generazione di linee cellulari persistentemente infette da FIV ha rappresentato una pietra miliare nella produzione su larga scala di virus, antigeni virali e di cellule infette, e ha contribuito a molti altri aspetti della ricerca su FIV (Yamamoto *et al*., 1991).

L'ottenimento di un'immunità contro i diversi ceppi di FIV e le sue forme ricombinanti che circolano nella popolazione è stato altrettanto difficile come per vaccini contro l'HIV.

Gli anticorpi specifici contro il FIV sono stati individuati come essenziali per la protezio-

ne contro virus omologo, ma hanno anche a volte migliorato la successiva infezione da FIV (Siebelink *et al*., 1995).

Negli Stati Uniti nel 2002 è stato brevettato un vaccino costituito da cellule infettate con i sottotipi A e D di FIV inattivati e da un virus intero inattivato in adiuvante. Questo vaccino, che ha dimostrato un'efficacia variabile dal 20 al 100% (Yamamoto *et al*., 2010) ha rappresentato un risultato notevole anche in termini di ricerca di vaccini per l'HIV, sebbene in uno studio successivo la vaccinazione di gatti ripetuta per tre volte non ha dimostrato protezione contro l'infezione per via intramuscolare con un sottotipo A di FIV simile a quelli che circolano nel Regno Unito (Dunham *et al*., 2006). Comunque, il modello d'infezione da FIV nel gatto si presta molto bene per la valutazione di vaccini sperimentali contro HIV nell'uomo.

Il ricorso alla terapia anti-retrovirale, e in particolare alla HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy - terapia anti-retrovirale altamente attiva) ha notevolmente ridotto la morbilità e la mortalità in corso di infezione da HIV. Anche se la replicazione virale non è stata bloccata completamente con la terapia antivirale, essa procede a bassi livelli e le mutazioni del genoma virale sono notevolmente rallentate.

La terapia anti-retrovirale non è comunemente adottata nei gatti infetti da FIV, nonostante siano stati utilizzati composti che interferiscono con le diverse fasi del ciclo di replicazione virale (Mohammadi e Bienzle, 2012). Tuttavia, le analogie tra le proteasi di HIV e FIV sono state caratterizzate in dettaglio, e possono essere la base per la messa a punto di farmaci inibitori delle proteasi di HIV (Lin *et al*., 2011).

In conclusione, dal punto di vista della patologia comparata, la patogenesi dell'infezione da FIV nel gatto si situa a un livello intermedio tra quella dei virus dei primati (SIV) e dell'uomo (HIV). L'infezione da FIV nel gatto riproduce, con un buon livello di analogia, quanto accade nell'uomo infetto da HIV, offrendo l'opportunità di esplorare i meccanismi di interazione tra virus e ospite e rendendola un modello adatto allo studio di strumenti profilattici e terapeutici, a un costo inferiore rispetto all'uso di modelli sperimentali rappresentati da primati.

Bibliografia

- Ackley C.D., Yamamoto J.K., Levy N., Pedersen N.C., Cooper M.D., 1990. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. J. Virol. 64, 5652–5655.
- Bande F., Arshad S.S., Hassan, L., Zakaria Z., Sapian N.A., Rahman N.A., Alazawy A., 2012. Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. BMC Vet. Res. 8, 33.
- Celestino M., Calistri A., Del Vecchio C., Salata C., Chiuppesi F., Pistello M., Borsetti A., Palù G., Parolin C., 2012. Feline tetherin is characterized by a short N-terminal region and is counteracted by the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein. J. Virol. 86, 6688–6700.
- Chhetri B.K., Berke O., Pearl D.L., Bienzle D., 2013. Comparison of the geographical distribution of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in the United States of America (2000–2011). BMC Vet. Res. 9, 2.
- Coffin J., Swanstrom R., 2013. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3, 1–17.
- Dean G.A., LaVoy A., Yearley J., Stanton C., 2006. Cytokine modulation of the innate immune response in feline immunodeficiency virus-infected cats. J. Infect. Dis. 193, 1520–1527.
- Dunham S.P., Bruce J., MacKay S., Golder M., Jarrett O., Neil J.C., 2006. Limited efficacy of an inactivated feline immunodeficiency virus vaccine. Vet. Rec. 158, 561–562.
- Elder J.H., Lin Y.C., Fink E., Grant C.K., 2010. Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels withHIV. Curr. HIV Res. 8, 73–80.
- Gabor L.J., Love D.N., Malik R., Canfield P.J., 2001. Feline immunodeficiency virus status of Australian cats with lymphosarcoma. Aust. Vet. J. 79, 540–545.
- Hahn B.H., Shaw G.M., De Cock K.M., Sharp P.M., 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. Science 287, 607–614.
- Harari A., Pantaleo G., 2008. HIV-1-specific immune response. Adv. Pharmacol. 56, 75–92.
- Hartmann K., 2012. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. Viruses 4, 2684–2710.
- Hofmann-Lehmann R., Berger M., Sigrist B., Schawalder P., Lutz H., 1998. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection leads to increased incidence of feline odontoclastic resorptive lesions (FORL). Vet. Immunol. Immunopathol. 65, 299–308.
- Hong, Y., Fink, E., Hu, Q.Y., Kiosses, W.B., Elder, J.H., 2010. OrfA down-regulates feline immunodeficiency virus primary receptor CD134 onthe host cell surface and is important in viral infection. J. Virol. 84,7225–7232.
- Howard K.E., Reckling S.K., Egan E.A., Dean G.A., 2010. Acute mucosal pathogenesis of feline immunodeficiency virus is independent of viral dose in vaginally infected cats. Retrovirology 7, 2.
- Iwasaki A., 2012. Innate immune recognition of HIV-1. Immunity 37,389–398.
- Kraase M., Sloan R., Klein D., Logan N., McMonagle L., Biek R., Willett B.J., Hosie M.J., 2010. Feline immunodeficiency virus *env* gene evolution in experimentally infected cats. Vet. Immunol. Immunopathol. 134, 96–106.
- Lee I.T., Levy J.K., Gorman S.P., Crawford P.C., Slater M.R., 2002. Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 220, 620–622.
- Lerner D.L., Wagaman P.C., Phillips T.R., Prospero-Garcia O., Henriksen S.J., Fox H.S., Bloom F.E., Elder J.H., 1995. Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 7480–7484.

– Li Z., Phadke A., Weaver E.A., Ball J.M., Collisson E.W., 2005. Feline CD8+cells induced with FIV infected, irradiated T cells produce multiple anti-FIV factors. Dev. Comp. Immunol. 29, 809–824.
– McCarthy M., 2013. Large US study of HIV vaccine is halted because of lack of efficacy. BMJ 346, f2734.
– McDermott A.B., Koup R.A., 2012. CD8(+) T cells in preventing HIV infection and disease. AIDS 26, 1281–1292.
– McEwan W.A., McMonagle E.L., Logan N., Serra R.C., Kat P., Vandewoude S., Hosie M.J., Willett B.J., 2008. Genetically divergent strains of feline immunodeficiency virus from the domestic cat (*Felis catus*) and the African lion (*Panthera leo*) share usage of CD134 and CXCR4 as entry receptors. J. Virol. 82, 10953–10958.
– McEwan W.A., Schaller T., Ylinen L.M., Hosie M.J., Towers G.J., Willett B.J., 2009. Truncation of TRIM5 in the *Feliformia* explains the absence of retroviral restriction in cells of the domestic cat. J. Virol. 83, 8270–8275.
– Meeker R.B., Bragg D.C., Poulton W., Hudson L., 2012. Transmigration of macrophages across the choroid plexus epithelium in response to the feline immunodeficiency virus. Cell Tissue Res. 347, 443–455.
– Miller C., Bielefeldt-Ohmann H., MacMillan M., Huitron-Resendiz S., Henriksen S., Elder J., VandeWoude S., 2011. Strain-specific viral distribution and neuropathology of feline immunodeficiency virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 143, 282–291.
– Miller M.M., Fogle J.E., Ross P., Tompkins M.B., 2013. Feline glycoprotein a repetitions predominant anchors transforming growth factor beta on the surface of activated CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and mediates AIDS lentivirus-induced T cell immunodeficiency. AIDS Res. Hum. Retroviruses 29, 641–651.
– Mohammadi H., Bienzle D., 2012. Pharmacological inhibition of feline immunodeficiency virus (FIV). Viruses 4, 708–724.
– Nakagaki K., Nakagaki K., Takahashi K., Schols D., De Clercq E., Tabira T., 2001. CXCR4 is the primary receptor for feline immunodeficiency virus in astrocytes. J. Neurovirol. 7, 487–492.
– O'Brien S.J., Troyer J.L., Brown M.A., Johnson W.E., Antunes A., Roelke M.E., Pecon-Slattery J., 2012. Emerging viruses in the felidae: shifting paradigms. Viruses 4, 236–257.
– de Parseval A., Chatterji U., Sun P., Elder J.H., 2004. Feline immunodeficiency virus targets activated CD4+ T cells by using CD134 as a binding receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 13044–13049.
– Pecon-Slattery J., McCracken C.L., Troyer J.L., VandeWoude S., Roelke M., Sondgeroth K., Winterbach, C., Winterbach H., O'Brien S.J., 2008. Genomic organization, sequence divergence, and recombination of feline immunodeficiency virus from lions in the wild. BMC Genomics 9, 66.
– Peeters M., Delaporte E., 2012. Simian retroviruses in African apes. Clin. Microbiol. Infect. 18, 514–520.
– Poli A., Tozon N., Guidi G., Pistello M., 2012. Renal alterations in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: a natural model of lentivirus-induced renal disease changes. Viruses 4, 1372–1389.
– Reggeti F., Bienzle D., 2004. Feline immunodeficiency virus subtypes A, Band C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. J. Gen. Virol. 85, 1843–1852.
– Reggeti F., Ackerley C., Bienzle D., 2008. CD134 and CXCR4 expression corresponds to feline immunodeficiency virus infection of lymphocytes, macrophages and dendritic cells. J. Gen. Virol. 89, 277–287.
– Scott V.L., Boudreaux C.E., Lockett N.N., Clay B.T., Coats K.S., 2011. Cytokine

dysregulation in early- and late-term placentas from feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats. Am. J. Reprod. Immunol. 65, 480–491.
– Scott V.L., Burgess S.C., Shack L.A., Lockett N.N., Coats K.S., 2008. Expression of CD134 and CXCR4 mRNA in term placentas from FIV-infected and control cats. Vet. Immunol. Immunopathol. 123, 90–96.
– Sharp P.M., Hahn B.H., 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 1, 1–22.
– Shimojima M., Miyazawa T., Ikeda Y., McMonagle E.L., Haining H., Akashi H., Takeuchi Y., Hosie M.J., Willett B.J., 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. Science 303, 1192–1195.
– Siebelink K.H., Tijhaar E., Huisman R.C., Huisman W., de Ronde A., Darby I.H., Francis M.J., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., 1995. Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. J. Virol. 69, 3704–3711.
– Simões R.D., Howard K.E., Dean G.A., 2012. In vivo assessment of natural killer cell responses during chronic feline immunodeficiency virus infection. PLoS One 7, e37606.
– Sprague W.S., TerWee J.A., VandeWoude S., 2010. Temporal association of large granular lymphocytosis, neutropenia, proviral load, and FasL mRNA in cats with acute feline immunodeficiency virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 134, 115–121.
– Stoeker L.L., Overman E.L., Nordone S.K., Moeser A.J., Simões R.D., Dean G.A., 2013. Infection with feline immunodeficiency virus alters intestinal epithelial transport and mucosal immune responses to probiotics. Vet. Immunol. Immunopathol. 153, 146–152.
– Takehisa J., Kraus M.H., Ayouba A., Bailes E., Van Heuverswyn F., Decker J.M., Li, Y., Rudicell R.S., Learn G.H., Neel C., Ngole E.M., Shaw G.M., Peeters M., Sharp, P.M., Hahn, B.H., 2009. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. J Virol. 83, 1635-1648.
– Teixeira B.M., Hagiwara M.K., Cruz J.C., Hosie M.J., 2012. Feline immunodeficiency virus in South America. Viruses 4, 383–396.
– Tompkins M.B., Tompkins W.A., 2008. Lentivirus-induced immune dysregulation. Vet. Immunol. Immunopathol. 123, 45–55.
– Tompkins M.B., Bull M.E., Dow J.L., Ball J.M., Collisson E.W., Winslow B.J., Phadke A.P., Vahlenkamp T.W., Tompkins W.A., 2002. Feline immunodeficiency virus infection is characterized by B7+CTLA4+ T cell apoptosis. J. Infect. Dis. 185, 1077–1093.
– Walker B., McMichael A., 2012. The T-cell response to HIV. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2.
– Weaver E.A., 2010. A detailed phylogenetic analysis of FIV in the United States. PLoS One 5, e12004.
– Willett B.J., Hosie M.J., 2008. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 123, 56–64.
– Yamamoto J.K., Ackley C.D., Zochlinski H., Louie H., Pembroke E., Torten M., Hansen H., Munn R., Okuda T., 1991. Development of IL-2-independent feline lymphoid cell lines chronically infected with feline immunodeficiency virus: importance for diagnostic reagents and vaccines. Intervirology 32, 361–375.
– Yamamoto J.K., Sanou M.P., Abbott J.R., Coleman J.K., 2010. Feline immunodeficiency virus model for designing HIV/AIDS vaccines. Curr. HIV Res. 8, 14–25.
– Yang X., Jiao Y.M., Wang R., Ji Y.X., Zhang H.W., Zhang Y.H., Chen D.X., Zhang T., Wu H., 2012. High CCR5 density on central memory CD4+ T cells in acute HIV-1 infection is mostly associated with rapid disease progression. PLoS One 7, e49526.
– Zielonka J., Münk C., 2011. Cellular restriction factors of feline immuno-deficiency virus. Viruses 3, 1986–2005.

L'INFEZIONE DA MORBILLIVIRUS NEI CETACEI: UN INTERESSANTE MODELLO DI STUDIO E DI NEUROPATOLOGIA COMPARATA

GIOVANNI DI GUARDO[1], SANDRO MAZZARIOL[2], WALTER MIGNONE[3], FRANCO GUARDA[4]

[1] Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo; [2] Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova; [3] Centro di Referenza Nazionale per le Indagini Diagnostiche sui Mammiferi Marini Spiaggiati (C.Re.Di.Ma.), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Imperia; [4] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Nel corso degli ultimi 25-30 anni, almeno 9 distinte epidemie da *Morbillivirus* hanno interessato le popolazioni di Cetacei di più aree del nostro Pianeta (Van Bressem *et al*., 2014).

Le stenelle striate (*Stenella coeruleoalba*) hanno costituito il principale "bersaglio" dei 4 episodi di mortalità collettiva registratisi nel Mediterraneo occidentale tra il 1990 e il 2013, condividendo tale prerogativa con i globicefali (*Globicephala melas*), la cui popolazione è stata gravemente coinvolta nell'epidemia verificatasi nella medesima regione tra il 2006 e il 2008 (Fernández *et al*., 2008; Raga *et al*., 2008; Di Guardo e Mazzariol, 2013; Casalone *et al*., 2014; Van Bressem *et al*., 2014). I tursiopi (*Tursiops truncatus*), a loro volta, hanno rappresentato la specie principalmente interessata dai 4 eventi epidemici che hanno avuto luogo, tra il 1982 e il 2014, lungo le coste orientali statunitensi (1982, 1987-1988, 2013-2014) e messicane (1994) (Lipscomb *et al*., 1994a; Lipscomb *et al*., 1994b; Krafft *et al*., 1995; Lipscomb *et al*., 1996; Di Guardo *et al*., 2005; Van Bressem *et al*., 2009; Van Bressem *et al*., 2014), mentre i delfini comuni (*Delphinus delphis ponticus*) sono stati seriamente colpiti dall'epidemia registratasi nel corso del 1994 nel Mar Nero (Birkun *et al*., 1999; Di Guardo *et al*., 2005; Van Bressem *et al*., 2009).

La patologia delle infezioni morbillivirali nei Cetacei ricalca quella osservata nelle analoghe infezioni dei mammiferi terrestri e dell'uomo (Kennedy, 1998; Di Guardo *et al*., 2005; Van Bressem *et al*., 2009; Van Bressem *et al*., 2014; Morris et al., 2015), risultando caratterizzata da una consistente deplezione linfocitaria a carico di numerosi distretti linfoidi dell'ospite. Ciò costituisce la logica premessa per il successivo sviluppo di una grave condizione di immunodeficienza secondaria, che esita a sua volta nella comparsa di un più o meno ampio spettro di infezioni opportunistiche a eziologia virale, batterica, fungina, protozoaria e/o parassitaria (Domingo *et al*., 1992; Di Guardo *et al*., 1995; Kennedy, 1998; Di Guardo *et al*., 2005; Fernández *et al*., 2008; Van Bressem *et al*., 2009; Mazzariol *et al*., 2012; Van Bressem *et al*., 2014). In un siffatto contesto, appare degno di nota il fatto che alcune fra le *noxae* biologiche responsabili delle suddette infezioni - quali ad esempio Herpesvirus e *Toxoplasma gondii* - possano svolgere in determinate circostanze il ruolo di agenti patogeni primari a spiccata attitudine neurotropa (Kennedy *et al*., 1992; Di Guardo *et al*., 2010; Di Guardo *et al*., 2011b; Sierra *et al*., 2014a), inducendo nei Cetacei infetti a opera degli stessi lo sviluppo di lesioni encefalitiche più o meno reminiscenti di quelle apprezzate in corso d'infezione da Morbillivirus (Domingo *et al*., 1992; Kennedy, 1998; Fernández *et al*., 2008; Raga *et al*., 2008; Van Bressem *et al*., 2009; Van Bressem *et al*., 2014). I reperti patologici che caratterizzano le infezioni da Morbillivirus nei Cetacei sono riconducibili a quelli tipici delle encefaliti virali, risultando frequentemente accompagnati da contestuali quadri di polmonite bronco/bronchiolo-interstiziale subacuto-cronica bilaterale (Domingo *et al*., 1992; Di Guardo *et al*.,

1995; Kennedy, 1998; Di Guardo *et al*., 2005; Fernández *et al*., 2008; Raga *et al*., 2008; Van Bressem *et al*., 2009; Van Bressem *et al*., 2014). Inoltre, nelle cellule virus-infette presenti a livello cerebrale, polmonare, linfonodale e splenico, così come in più tessuti e distretti epiteliali e mucosali dell'ospite, si rilevano più o meno voluminose inclusioni virali eosinofile, a localizzazione nucleare e/o citoplasmatica e frequentemente osservabili anche nei sincizi multinucleati che costituiscono, a loro volta, un reperto microscopico assolutamente peculiare nell'ambito delle infezioni da Morbillivirus dei mammiferi acquatici e terrestri. Questo è il caso, nella fattispecie, dei "sincizi di "*Warthin-Finkeldey*" apprezzabili in sede polmonare, unanimemente ritenuti il "correlato istopatologico" tipicamente ascrivibile alle infezioni morbillivirali umane e animali e, più nello specifico, all'infezione da Morbillivirus nei Cetacei (Domingo *et al*., 1992; Di Guardo *et al*., 1995; Kennedy, 1998; Di Guardo *et al*., 2005; Fernández *et al*., 2008; Raga *et al*., 2008; Van Bressem *et al*., 2009; Van Bressem *et al*., 2014; Sierra *et al*., 2014b).

Nei Cetacei Morbillivirus-infetti, le indagini immunoistochimiche condotte mediante l'impiego di anticorpi monoclonali specificamente rivolti verso i vari antigeni virali ("nucleoproteina" o "antigene N", *in primis*) consentono di rilevare, nelle forme "classiche" o "canoniche" d'infezione, la presenza di più o meno abbondanti depositi di antigene morbillivirale a livello degli organi e dei tessuti linfoidi, nonché in ambito polmonare, encefalico e, in minor misura, in una serie di distretti epiteliali, ghiandolari e/o mucosali dell'ospite. Un'immunoreattività di grado particolarmente pronunciato sarà apprezzabile, inoltre, sia in corrispondenza dei summenzionati elementi sinciziali sia a livello delle inclusioni virali presenti nel nucleo e/o nel citoplasma delle cellule virus-infette (Domingo *et al*., 1992; Di Guardo *et al*., 1995; Kennedy, 1998; Di Guardo *et al*., 2005; Fernández *et al*., 2008; Raga *et al*., 2008; Van Bressem *et al*., 2009; Van Bressem *et al*., 2014; Sierra *et al*., 2014b).

Di speciale rilevanza e interesse, dal punto di vista della neuropatologia comparata e della neuropatogenesi delle infezioni virali, sono poi quelle peculiari forme infettive in cui si realizzerebbe un esclusivo coinvolgimento della compagine cerebrale dell'ospite. Segnalate con crescente frequenza in esemplari di stenella striata rinvenuti spiaggiati lungo le coste della Spagna e dell'Italia dopo le epidemie del 1990-1992 (figg. 1, 2) e del 2006-2008 (fig. 3) (Domingo *et al*., 1995; Di Guardo *et al*., 2011a; Soto *et al*., 2011; Di Guardo *et al*., 2013), queste singolari forme d'infezione da Morbillivirus (c.d. "*brain-only*" *forms of* Dolphin Morbillivirus *infection*, BOFDI) sono state pure descritte in un tursiope spiaggiatosi lungo le coste laziali nel 2011 (Di Guardo *et al*., 2013), nonché in un individuo di *Lagenorhynchus albirostris* "ospedalizzato" a seguito del relativo spiaggiamento *intra vitam* (Van Elk *et al*., 2014) e in ulteriori 4 esemplari di stenella striata rinvenuti spiaggiati lungo le coste delle Isole Canarie fra il 2002 e il 2011 (Van Bressem *et al*., 2014).

Gli animali BOFDI-affetti mostrano la presenza di genoma e/o di antigene morbillivirale esclusivamente a livello del tessuto cerebrale (figg. 4, 5), analogamente a quanto si riscontra in pazienti umani affetti da "*panencefalite subacuta sclerosante*" ("*subacute sclerosing panencephalitis*", SSPE) e in cani affetti da "*encefalite del cane anziano*" ("*old dog encephalitis*", ODE), entità nosologiche che rappresentano i "postumi" neurologici di un ristretto numero di casi d'infezione da virus del morbillo (*Measles Virus*, MeV) e da virus del cimurro (*Canine Distemper Virus*, CDV), rispettivamente nella specie umana e in quella canina. Dal canto loro, anche i quadri neuro-istolesivi che si osservano in ambito encefalico negli esemplari di stenella striata BOFDI-affetti presentano numerose analogie rispetto a quelli descritti in pazienti umani con SSPE e in cani ODE-affetti (Domingo *et al*., 1995; Reuter e Schneider-Schaulies, 2010; Sato *et al*., 2012; Di Guardo e Mazzariol, 2013; Van Bressem *et al*., 2014; Di Guardo & Mazzariol, 2016).

A tal proposito, viste e considerate le lacune conoscitive esistenti rispetto ai fattori che re-

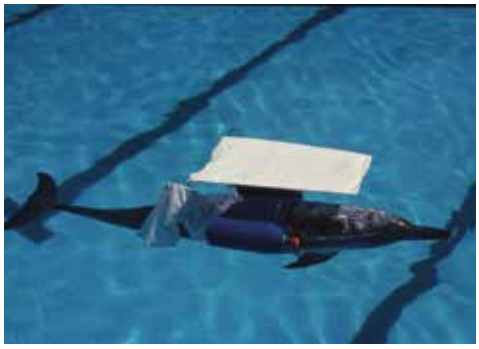


Fig. 1. Stenella striata (*Stenella coeruleoalba*). Infezione da Morbillivirus. Esemplare adulto, maschio, rinvenuto spiaggiato lungo le coste laziali nel 1993 e deceduto dopo 15 giorni di "ospedalizzazione" all'interno della piscina mostrata nell'immagine. Grazie alle approfondite indagini immunoistochimiche effettuate, è stato possibile documentare la presenza di antigene morbillivirale esclusivamente a livello del tessuto encefalico dell'animale.

Fig. 2. Stenella striata (*S. coeruleoalba*). Encefalite da Morbillivirus. Stesso esemplare rappresentato nell'immagine precedente. Aspetto macroscopico del cervello a seguito di apertura della scatola cranica. Da notare, unitamente a un certo grado di ispessimento meningeo, una diffusa iperemia meningo-encefalica.

golano le complesse dinamiche d'interazione virus-ospite, sarebbe opportuno acquisire una serie di adeguate informazioni sui meccanismi che sono alla base della colonizzazione e della reiterata persistenza dell'agente virale nel tessuto cerebrale degli esemplari di stenella striata cronicamente infetti a opera di Morbillivirus (Di Guardo *et al*., 2013). Infatti, il recettore noto con l'acronimo SLAM/CD150 (*Signalling Lymphocyte Activation Molecule*), una molecola espressa sulla membrana cellulare e che pienamente giustifica lo spiccato linfotropismo dei morbillivirus animali e umani, non è espresso dalle cellule neuronali, in maniera analoga a quanto potrebbe avvenire per la *nectina-4*, un altro recettore cellulare primariamente coinvolto nell'epiteliotropismo di Morbillivirus (Sato *et al*., 2012). A dispetto di quanto sopra, è stato di recente ipotizzato che la *nectina-4* possa esser implicata nella neurovirulenza dell'agente responsabile del cimurro canino (CDV) (Pratakpiriya *et al*., 2012), che costituisce un modello accreditato nello studio comparativo delle infezioni da Morbillivirus umane e animali (Reuter e Schneider-Schaulies, 2010; Sato *et al*., 2012).

Fra i numerosi quesiti patogenetici tuttora aperti, si ritengono di particolare rilevanza quelli relativi alle "strategie" impiegate dai morbillivirus nella colonizzazione e nella persistenza degli stessi a livello del neuroparenchima cerebrale dei rispettivi ospiti, con conseguente sviluppo di SSPE in pazienti umani MeV-infetti (Reuter e Schneider-Schaulies, 2010; Sato *et al*., 2012), nonchè delle sue "controparti" in animali Morbillivirus-infetti, rappresentati da cani ODE-affetti e da esemplari di *S. coeruleoalba* BOFDI-affetti (Domingo *et al*., 1995; Di Guardo *et al*., 2011a; Soto *et al*., 2011; Di Guardo *et al*., 2013).

In riferimento a quanto sopra, e con il precipuo scopo di definire l'effettiva "validità ed affidabilità" delle succitate forme naturali d'infezione morbillivirale quali modelli di studio, di neuropatologia e di neuropatogenesi virale comparata nei confronti dei "postumi" neuro-

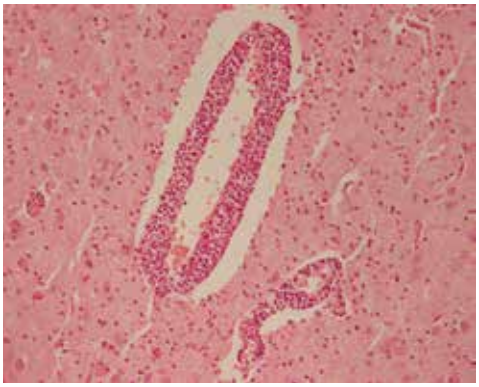


Fig. 3. Stenella striata (*S. coeruleoalba*). Encefalite da Morbillivirus in un giovanissimo esemplare di sesso maschile, rinvenuto spiaggiato nel 2009 lungo le coste laziali. Spessi manicotti di cellule infiammatorie mononucleate si osservano attorno ai vasi della sostanza grigia cerebrale, in sede sottocorticale. Colorazione con ematossilina-eosina; X 250.

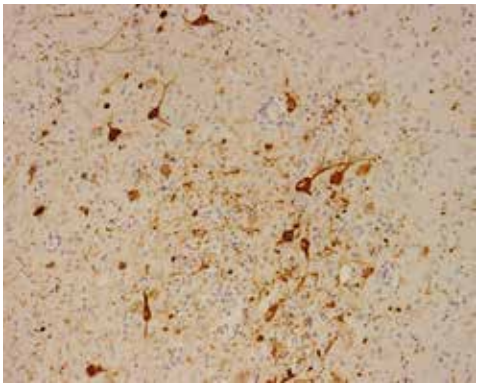


Fig. 4. Stenella striata (*S. coeruleoalba*). Encefalite da Morbillivirus. Stesso esemplare rappresentato nell'immagine precedente. Consistenti depositi di antigene morbillivirale si rinvengono all'interno del citoplasma e, in minor misura, anche nel nucleo dei neuroni corticali, così come in corrispondenza dei rispettivi prolungamenti assonali e dendritici e nel neuroparenchima circostante. Da notare che, a dispetto delle approfondite indagini immunoistochimiche e biomolecolari (RT-PCR) effettuate, è stato possibile documentare la presenza di antigene e di genoma virale esclusivamente a livello della compagine cerebrale dell'animale, senza un contestuale coinvolgimento del tessuto cerebellare. Immunoistochimica per Morbillivirus basata sull'impiego di un anticorpo monoclonale nei confronti dell'antigene N (nucleoproteina) di Canine Distemper Virus (CDV); colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer; X 250.

logici descritti in pazienti MeV-infetti, SSPE *in primis*, andrebbe sottolineato tuttavia che il "fenotipo morfo-patologico delle lesioni encefaliche", per quanto importante, non dovrebbe esser considerato l'unico parametro sul quale basare la "caratterizzazione" delle stenelle striate BOFDI-affette come potenziali "modelli" nello studio della SSPE umana. In effetti, mentre le stenelle striate del Mediterraneo, con particolare riferimento agli animali adulti, risulterebbero colpite con una certa frequenza da BOFDI "post-epidemiche" (Domingo *et al*., 1995; Di Guardo *et al*., 2011a; Soto *et al*., 2011; Di Guardo *et al*., 2013), la SSPE viene considerata un'entità nosologica di non comune riscontro fra i pazienti umani in età pediatrica (così come fra i giovani adulti), con una prevalenza pari 8-20 casi per milione di individui MeV-infetti (Garg, 2008; Oldstone, 2009; Kweder *et al*., 2015). Inoltre, cosa ancora più importante, i

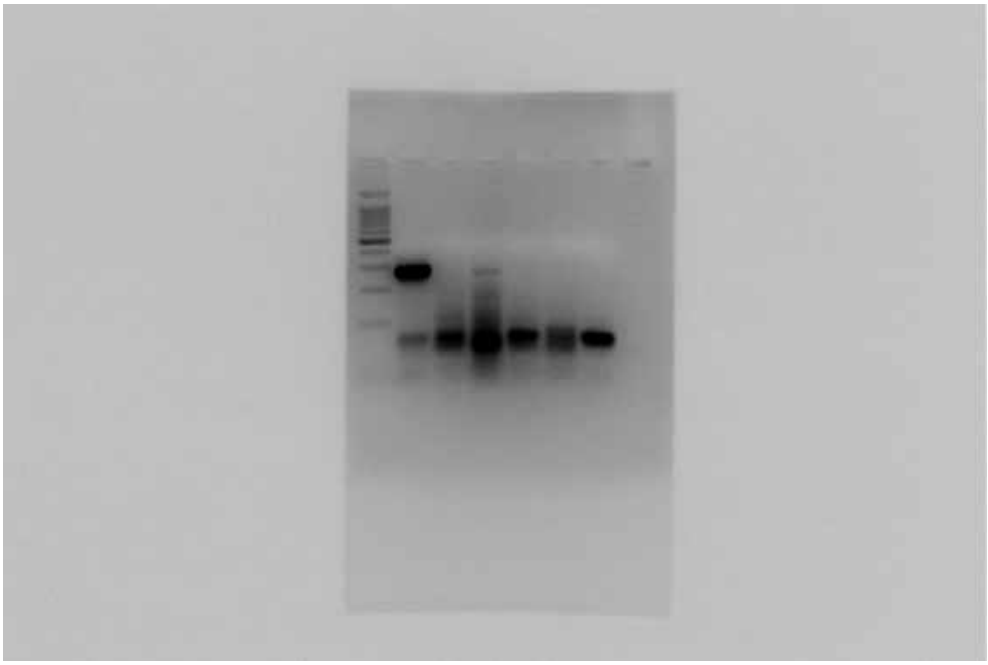


Fig. 5. Stenella striata (*S. coeruleoalba*). Encefalite da Morbillivirus. Stesso esemplare rappresentato nelle due immagini precedenti (figg. 3, 4). *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) per Morbillivirus, basata sull'amplificazione di un frammento del gene N, altamente conservato fra i membri del genere Morbillivirus e di lunghezza pari a 287 bp. Da sinistra verso destra: presenza di una banda "specifica", di peso molecolare sovrapponibile al "controllo positivo" (corsia/*lane* 2), a livello della corsia/*lane* 4, corrispondente al tessuto cerebrale dell'animale. Assenza di qualsivoglia segnale/amplificato a livello di tutte le rimanenti bande/*lanes* del gel, corrispondenti a cervelletto, polmone, milza e linfonodi; banda/*lane* 1=marcatore di peso molecolare.

ceppi/genotipi virali responsabili dei casi di SSPE nella nostra specie appaiono caratterizzati da una serie di mutazioni prevalentemente a carico del gene M (codificante per la proteina di matrice) e, meno frequentemente, a livello dei geni F e H (codificanti, rispettivamente, per la proteina di fusione e per l'emoagglutinina virale). I succitati eventi mutazionali a carico del genoma di MeV sono stati altresì correlati con l'acquisizione, da parte dell'agente virale, di una più spiccata capacità di diffusione all'interno del tessuto cerebrale dell'ospite, oltre che di una ridotta capacità di produrre particelle virali infettanti "*cell-free*" (Garg, 2008; Oldstone, 2009; Moulin *et al*., 2011; Kweder *et al*., 2015).

Per quanto ci è dato sapere, ricerche di questo tipo non sono state finora condotte su esemplari di *S. coeruleoalba* BOFDI-affetti. Grazie a siffatti studi, che a giusto titolo andrebbero considerati di rilevanza cruciale, potremmo infatti valutare "fino a che punto" le stenelle striate BOFDI-affette possano esser ritenute un modello "affidabile" di neuropatologia e di neuropatogenesi virale comparata rispetto alla SSPE nella specie umana (Di Guardo e Mazzariol, 2016).

Di notevole importanza, nel contesto in esame, sono anche le popolazioni cellulari - neuronali e non - che risultano progressivamente colonizzate, a opera di Morbillivirus, a livello del neuroparenchima cerebrale degli esemplari di *S. coeruleoalba* BOFDI-affetti. A tal proposito, sarebbe interessante definire se uno o più ceppi virali siano contraddistinti da un comportamento neurotropo "selettivo" se non addirittura "esclusivo", un processo quest'ultimo nella cui dinamica potrebbe rientrare l'interazione dell'agente patogeno con determinate molecole e/o sistemi/complessi recettoriali espressi dai neuroni o da altri elementi cellulari residenti in ambito encefalico (Di Guardo e Mazzariol, 2013; Di Guardo e Mazzariol, 2016). In corso d'infezione cimurrosa nella specie canina, per esempio, la prolungata persistenza dell'agente virale (CDV) a livello del tessuto cerebrale dell'ospite è stata messa in relazione ad una modalità di diffusione "non citolitica/non citopatogena" dell'infezione, che a sua volta prevederebbe la propagazione del virus all'interno degli astrociti, i quali ne sarebbero colonizzati mediante l'utilizzo di un recettore ancora non identificato (Fluehmann *et al*., 2010; Alves *et al*., 2015).

Un ulteriore elemento d'interesse risiede nella possibilità che le infezioni da Morbillivirus possano esser acquisite, anche nei Cetacei, per via trans-placentare, in maniera del tutto analoga a quanto riportato in corso d'infezione cimurrosa nel cane (Pandher *et al*., 2006). Una siffatta evenienza è stata seriamente sospettata, se non addirittura documentata, in più specie di Cetacei - sia Odontoceti che Misticeti - rivelatesi suscettibili nei confronti di tali infezioni, quali la stenella striata (Domingo *et al*., 1992; Di Guardo *et al*., 2011a), il globicefalo (Fernández *et al*., 2008), il capodoglio (*Physeter macrocephalus*) (West *et al*., 2015; Centelleghe *et al*., 2016) e la balenottera comune (*Balaenoptera physalus*) (Mazzariol *et al*., 2016). A tal proposito, non andrebbe neppure sottovalutato l'impatto, di grado verosimilmente consistente, che un'elegante e sofisticata "strategia d'infezione" come quella sopra descritta potrebbe esercitare nei confronti della patogenicità di agenti virali quali i morbillivirus, che sono "tradizionalmente" caratterizzati da un elevato potere patogeno. Al succitato incremento di patogenicità potrebbe plausibilmente contribuire anche la riduzione della "capacità immunologica" che viene "fisiologicamente" osservata durante il periodo gestazionale (Sykes *et al*., 2012). D'indubbio interesse e rilevanza sarebbe, nello specifico contesto in esame, anche lo studio dell'immunopatogenesi dell'infezione morbillivirale in esemplari di *S. coeruleoalba* con immunofenotipo dominante *T-helper* (Th)1 e con immunofenotipo dominante Th2 (Van Bressem *et al*., 2014), sulla falsariga di quanto ampiamente documentato in corso d'infezione da *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), così come in una serie di ulteriori modelli d'infezione naturale nell'uomo e negli animali. Nelle due succitate categorie di pazienti, infatti, il decorso patogenetico dell'infezione da HIV presenta sostanziali differenze, dal momento che solo gli individui con immunofenotipo dominante Th2 tendono a sviluppare la malattia (AIDS) in forma clinicamente manifesta (Romagnani, 2000).

Alla luce di quanto sopra, sarebbe opportuno che le ricerche focalizzate sull'immunopatogenesi dell'infezione da Morbillivirus nelle diverse specie cetologiche sensibili - *S. coeruleoalba in primis*, nonchè *T. truncatus* e *G. melas in secundis* - si concentrassero con particolare attenzione sui livelli di espressione del principale recettore virale, il complesso SLAM/CD150, così come sui livelli di espressione degli altri recettori virali nei diversi tessuti dell'ospite, sia in esemplari con immunofenotipo dominante Th1 sia in individui con immunofenotipo dominante Th2 (Di Guardo e Mazzariol, 2016). Inoltre, considerata la posizione di "predatori apicali" notoriamente occupata dai Cetacei Odontoceti all'interno delle catene trofiche in ambito marino (Fossi *et al*., 2007), si ritiene di cruciale rilevanza anche lo studio delle complesse dinamiche d'interazione virus-ospite in rapporto agli effetti sinergizzanti potenzialmente esplicati da una folta gamma di contaminanti ambientali persistenti, ad azione immunotossica e neurotossica, che questi animali sono in grado sia di "bioaccumulare" sia di "biomagnificare" fino al raggiungimento di elevatissime concentrazioni nei propri tessuti (Fossi *et al*., 2007; Di Guardo e Mazzariol, 2016).

Infine, due ulteriori aspetti appaiono meritevoli di particolare interesse.

Il primo di essi riguarda il cosiddetto "spettro d'ospite" del virus, che nel corso degli ultimi anni ha mostrato una progressiva espansione, come chiaramente documentato dai recenti casi d'infezione segnalati nella popolazione di balenottere comuni del Mediterraneo occidentale (Di Guardo *et al*., 2011c; Mazzariol *et al*., 2012; Casalone *et al*., 2014; Mazzariol *et al*., 2016) e, cosa ancor più sorprendente, perfino in un esemplare di foca comune (*Phoca vitulina*) mantenuto in ambiente controllato (Mazzariol *et al*., 2013). Mentre un simile fenomeno potrebbe esser giustificato e anche "falsato", da un lato, dall'accresciuto numero di studi più o meno recentemente effettuati in diverse aree geografiche del Pianeta su Cetacei spiaggiati, andrebbe parimenti sottolineato, dall'altro lato, che "ceppi/isolati" virali con notevoli differenze genomiche e antigeniche rispetto a quelli identificati nell'Emisfero Boreale sono stati recentemente caratterizzati da singoli esemplari di Cetacei Odontoceti rinvenuti spiaggiati sulle coste brasiliane e dell'Australia occidentale (Groch *et al*., 2014; Stephens *et al*., 2014), così come alle Isole Hawaii (West *et al*., 2013; Jacob *et al*., 2016). Le differenze genetiche fra i succitati isolati e quelli identificati nei Cetacei dell'Emisfero Boreale e, più in particolare, in quelli del Mediterraneo occidentale (West *et al*., 2013; Groch *et al*., 2014; Stephens *et al*., 2014) sarebbero talmente marcate da rendere "opinabile" l'inclusione dei primi nel cosiddetto "*Cetacean* Morbillivirus (CeMV) *clade*" (Di Guardo e Mazzariol, 2014; Van Bressem *et al*., 2014).

Inoltre, e ciò rappresenta il secondo aspetto meritevole d'interesse, il "fenotipo patologico" osservato negli animali Morbillivirus-infetti dell'Emisfero Australe divergerebbe in maniera consistente rispetto a quello "classicamente" apprezzato in corso d'infezione morbillivirale nei Cetacei dell'Emisfero Boreale (Groch *et al*., 2014; Stephens *et al*., 2014). A tal proposito, infatti, nessuna evidenza di genoma e/o antigene virale è stata dimostrata all'interno del neuroparenchima cerebrale dei due esemplari di *Tursiops aduncus* rinvenuti spiaggiati lungo le coste dell'Australia occidentale e dai quali uno dei suddetti ceppi virali "emergenti" è stato isolato (Stephens *et al*., 2014). Parimenti degno di nota, a corollario di quanto sopra, è anche il fatto che, nonostante gli isolati di CeMV finora caratterizzati dalle stenelle striate nonchè dai globicefali e dalle balenottere comuni del Mediterraneo occidentale nel corso dei 4 episodi di mortalità collettiva verificatisi tra il 1990 e il 2013 risultino sostanzialmente identici dal punto di vista genomico (Fernández *et al*., 2008; Van Bressem *et al*., 2009; Bellière *et al*., 2011; Di Guardo *et al*., 2011c; Di Guardo e Mazzariol, 2013; Rubio-Guerri *et al*., 2013; Van Bressem *et al*., 2014), il "fenotipo patologico" che ha contraddistinto gli eventi del 2010-2011 e del 2013 è risultato divergente rispetto a quello osservato nelle epidemie del 1990-1992 e del 2006-2008, con particolare riferimento al tessuto-tropismo e alla patogenicità dell'agente virale, soprattutto per quel che concerne il suo neurotropismo e la sua neurovirulenza, unitamente alla localizzazione delle lesioni e alla distribuzione dell'antigene morbillivirale nei tessuti dell'ospite (Rubio-Guerri *et al*., 2013; Casalone *et al*., 2014).

In conclusione, e tenendo in debita considerazione quanto sopra esposto, si ritiene assolutamente necessario che la Comunità Scientifica profonda nel prossimo futuro adeguati sforzi finalizzati a definire, da un lato, i recettori virali espressi dai diversi tessuti e dalle diverse cellule dell'ospite nelle varie specie cetologiche suscettibili nei confronti dell'infezione e, dall'altro lato, a caratterizzare i diversi "ceppi/isolati" di Morbillivirus circolanti fra i Cetacei e, più in generale, fra i mammiferi acquatici che popolano il nostro Pianeta.

Bibliografia

- Alves, L., Khosravi, M., Avila, M., Ader-Ebert, N., Bringolf, F., Zurbriggen, A., Vandevelde, M., Plattet, P. (2015). SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus in astrocytes. *J. Virol*. 89, 5724-5733.
- Bellière, E.N., Esperón, F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2011). Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990-1992 and 2006-2008 Mediterranean outbreaks. *Infect. Genet. Evol*. 11, 1913-1920. Birkun, A. Jr., Kuiken, T., Krivokhizhin, S., Haines, D.M., Osterhaus, A.D., Van de Bildt, M.W., Joiris, C.R., Siebert, U. (1999). Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black Sea. *Vet. Rec*. 144, 85-92.
- Casalone, C., Mazzariol, S., Pautasso, A., Di Guardo, G., Di Nocera, F., Lucifora, G., Ligios, C., Franco, A., Fichi, G., Cocumelli, C., Cersini, A., Guercio, A., Puleio, R., Goria, M., Podestà, M., Marsili, L., Pavan, G., Pintore, A., De Carlo, E., Eleni, C., Caracappa, S. (2014). Cetacean strandings in Italy: An unusual mortality event along the Tyrrhenian Sea coast in 2013. *Dis. Aquat. Organ*. 109, 81-86.
- Centelleghe, C., Beffagna, G., Zanetti, R., Zappulli, V., Di Guardo, G., Mazzariol, S. (2016). Molecular analysis of Dolphin morbillivirus: A new sensitive detection method based on nested RT-PCR. *J. Virol. Methods* 235, 85-91.
- Di Guardo, G., Agrimi, U., Morelli, L., Cardeti, G., Terracciano, G., Kennedy, S. (1995). *Post mortem* investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. *Vet. Rec*. 136, 439-442.
- Di Guardo, G., Marruchella, G., Agrimi, U., Kennedy, S. (2005). *Morbillivirus* infections in aquatic mammals: A brief overview. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med*. 52, 88-93.
- Di Guardo, G., Proietto, U., Di Francesco, C.E., Marsilio, F., Zaccaroni, A., Scaravelli, D., Mignone, W., Garibaldi, F., Kennedy, S., Forster, F., Iulini, B., Bozzetta, E., Casalone, C. (2010). Cerebral toxoplasmosis in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Ligurian Sea coast of Italy. *Vet. Pathol*. 47, 245-253.
- Di Guardo, G., Cocumelli, C., Scholl, F., Di Francesco, C.E., Speranza, R., Pennelli, M., Eleni, C. (2011a). Morbilliviral encephalitis in a striped dolphin *Stenella coeruleoalba* calf from Italy. *Dis. Aquat. Organ*. 95, 247-251.
- Di Guardo, G., Di Cesare, A., Otranto, D., Casalone, C., Iulini, B., Mignone, W., Tittarelli, C., Meloni, C., Castagna, G., Forster, F., Kennedy, S., Traversa, D. (2011b). Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningo-encephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. *Vet. Parasitol*. 183, 31-36.
- Di Guardo, G., Mazzariol, S., Fernández, A. (2011c). Biologically threatened dolphins and whales. *Environ. Microbiol*. 13, 2833-2834.
- Di Guardo, G., Di Francesco, C.E., Eleni, C., Cocumelli, C., Scholl, F., Casalone, C., Peletto, S., Mignone, W., Tittarelli, C., Di Nocera, F., Leonardi, L., Fernández, A., Marcer, F., Mazzariol, S. (2013). *Morbillivirus* infection in cetaceans stranded along the Italian coastline: Pathological, immunohistochemical and biomolecular findings. *Res. Vet. Sci*. 94, 132-137.
- Di Guardo, G., Mazzariol, S. (2013). *Dolphin Morbillivirus*: A lethal but valuable infection model. *Emerg. Micr. Infect*. 2 (11), e74.
- Di Guardo, G., Mazzariol, S. (2014). *Cetacean Morbillivirus* in Northern and Southern Hemispheres. *Front. Microbiol*. 5, 211.
- Di Guardo, G., Mazzariol, S. (2016). *Cetacean Morbillivirus*-associated pathology: Knowns and unknowns. *Front. Microbiol*. 7, 112.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R., Kennedy, S. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of *Morbillivirus* infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet. Pathol*. 29, 1-10.

– Domingo, M., Vilafranca, M., Visa, J., Prats, N., Trudgett, A., Visser, I. (1995). Evidence for chronic *Morbillivirus* infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Vet. Microbiol.* 44, 229-239.
– Fernández, A., Esperón, F., Herráez, P., de los Monteros, A.E., Clavel, C., Bernabé, A., Sánchez-Vizcaino, J.M., Verborgh, P., DeStephanis, R., Toledano, F., Bayón, A. (2008). *Morbillivirus* and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 792-794.
– Fossi, M.C., Casini, S., Marsili, L. (2007). Potential toxicological hazard due to endocrine-disrupting chemicals on Mediterranean top predators: State of art, gender differences and methodological tools. *Environ. Res.* 104, 174-182.
– Garg, R.K. (2008). Subacute sclerosing panencephalitis. *J. Neurol.* 255, 1861-1871.
– Groch, K.R., Colosio, A.C., Marcondes, M.C., Zucca, D., Díaz-Delgado, J., Niemeyer, C., Marigo, J., Brandão, P.E., Fernández, A., Luiz Catão-Dias, J. (2014). Novel cetacean morbillivirus in Guiana dolphin, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 511-513.
– Jacob, J.M., West, K.L., Levine, G., Sanchez, S., Jensen, B.A. (2016). Initial characterization of novel beaked whale morbillivirus in Hawaiian cetaceans. *Dis. Aquat. Organ.* 117, 215-227.
– Kennedy, S., Lindstedt, I.J, McAliskey, M.M., McConnell, S.A., McCullough, S.J. (1992). Herpesviral encephalitis in a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J. Zoo Wildl. Med.* 23, 374-379.
– Kennedy, S. (1998). *Morbillivirus* infection in aquatic mammals. *J. Comp. Pathol.* 119, 201-225.
– Krafft, A., Lichy, J.H., Lipscomb, T.P., Klaunberg, B.A., Kennedy, S., Taubenberger, J.K. (1995). Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *J. Wildl. Dis.* 31, 410-415.
– Kweder, H., Ainouze, M., Brunel, J., Gerlier, D., Manet, E., Buckland, R. (2015). Measles virus: Identification in the M protein primary sequence of a potential molecular marker for subacute sclerosing panencephalitis. *Adv. Virol.* 2015, 769837.
– Lipscomb, T.P., Kennedy, S., Moffett, D., Ford, B.K. (1994a). Morbilliviral disease in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *J. Wildl. Dis.* 30, 572-576.
– Lipscomb, T.P., Schulman, F.Y., Moffett, D., Kennedy, S. (1994b). Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *J. Wildl. Dis.* 30, 567-571.
– Lipscomb, T.P., Kennedy, S., Moffett, D., Krafft, A., Klaunberg, B.A., Lichy, J.H., Regan, G.T., Worthy, G.A., Taubenberger, J.K. (1996). Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 283-290.
– Mazzariol, S., Marcer, F., Mignone, W., Serracca, L., Goria, M., Marsili, L., Di Guardo, G., Casalone, C. (2012). *Dolphin Morbillivirus* and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *BMC Vet. Res.* 8, 20.
– Mazzariol, S., Peletto, S., Mondin, A., Centelleghe, C., Di Guardo, G., Di Francesco, C.E., Casalone, C., Acutis, P.L. (2013). *Dolphin Morbillivirus* infection in a captive harbor seal (*Phoca vitulina*). *J. Clin. Microbiol.* 51, 708-711.
– Mazzariol, S., Centelleghe, C., Beffagna, G., Povinelli, M., Terracciano, G., Cocumelli, C., Pintore, A., Denurra, D., Casalone, C., Pautasso, A., Di Francesco, C.E., Di Guardo, G. (2016). Mediterranean fin whales (*Balaenoptera physalus*) threatened by *Dolphin Morbillivirus*. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 302-305.
– Morris, S.E., Zelner, J.L., Fauquier, D.A., Rowles, T.K., Rosel, P.E., Gulland, F., Grenfell, B.T. (2015). Partially observed epidemics in wildlife hosts: modelling an outbreak of

Dolphin Morbillivirus in the northwestern Atlantic, June 2013-2014. *J. R. Soc. Interface* 12 (112), pii: 20150676.
– Moulin, E., Beal, V., Jeantet, D., Horvat, B., Wild, T.F., Waku-Kouomou, D. (2011). Molecular characterization of measles virus strains causing subacute sclerosing panencephalitis in France in 1977 and 2007. *J. Med. Virol.* 83, 1614-1623.
– Oldstone, M.B. (2009). Modeling subacute sclerosing panencephalitis in a transgenic mouse system: Uncoding pathogenesis of disease and illuminating components of immune control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 330, 31-54.
– Pandher, K., Podell, B., Gould, D.H., Johnson, B.J., Thompson, S. (2006). Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 201-204.
– Pratakpiriya, W., Seki, F., Otsuki, N., Sakai, K., Fukuhara, H., Katamoto, H., Hirai, T., Maenaka, K., Techangamsuwan, S., Lan, N.T., Takeda, M., Yamaguchi, R. (2012). Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *J. Virol.* 86, 10207-10210.
– Raga, J.A., Banyard, A., Domingo, M., Corteyn, M., Van Bressem, M.F., Fernández, M., Aznar, F.J., Barrett, T. (2008). *Dolphin Morbillivirus* epizootic resurgence, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 471-473.
– Reuter, D., Schneider-Schaulies, J. (2010). Measles virus infection of the CNS: Human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med. Microbiol. Immunol.* 199, 261-271.
– Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 *versus* Th2). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85, 9-18.
– Rubio-Guerri, C., Melero, M., Esperón, F., Bellière, E.N., Arbelo, M., Crespo, J.L., Sierra, E., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Unusual striped dolphin mass mortality episode related to *Cetacean Morbillivirus* in the Spanish Mediterranean Sea. *BMC Vet. Res.* 9, 106.
– Sato, H., Yoneda, M., Honda, T., Kai, C. (2012). *Morbillivirus* receptors and tropism: Multiple pathways for infection. *Front. Microbiol.* 3, 75.
– Sierra, E., Sánchez, S., Saliki, J.T., Blas-Machado, U., Arbelo, M., Zucca, D., Fernández, A. (2014a). Retrospective study of etiologic agents associated with nonsuppurative meningoencephalitis in stranded cetaceans in the Canary Islands. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2390-2397.
– Sierra, E., Zucca, D., Arbelo, M., García-Álvarez, N., Andrada, M., Déniz, S., Fernández, A. (2014b). Fatal systemic *Morbillivirus* infection in bottlenose dolphin, Canary Islands, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 269-271.
– Soto, S., Alba, A., Ganges, L., Vidal, E., Raga, J.A., Alegre, F., González, B., Medina, P., Zorrilla, I., Martínez, J., Marco, A., Pérez, M., Pérez, B., Pérez de Vargas Mesas, A., Martínez Valverde, R., Domingo, M. (2011). Post-epizootic chronic *Dolphin Morbillivirus* infection in Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba*. *Dis. Aquat. Organ.* 96, 187-194.
– Stephens, N., Duignan, P.J., Wang, J., Bingham, J., Finn, H., Bejder, L. 1st, Patterson, A.P., Holyoake, C. (2014). *Cetacean Morbillivirus* in coastal Indo-Pacific bottlenose dolphins, Western Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 666-670.
– Sykes, L., MacIntyre, D.A., Yap, X.J., Teoh, T.G., Bennett, P.R. (2012). The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012, 967629.
– Van Bressem, M.F., Raga, J.A., Di Guardo, G., Jepson, P.D., Duignan, P.J., Siebert, U., Barrett, T., Santos, M.C., Moreno, I.B., Siciliano, S., Aguilar, A., Van Waerebeek, K. (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis. Aquat. Organ.* 86, 143-157.

– Van Bressem, M.F., Duignan, P.J., Banyard, A., Barbieri, M., Colegrove, K.M., De Guise, S., Di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernández, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K.R., Gulland, F., Jensen, B.A., Jepson, P.D., Hall, A., Kuiken, T., Mazzariol, S., Morris, S.E., Nielsen, O., Raga, J.A., Rowles, T.K., Saliki, J., Sierra, E., Stephens, N., Stone, B., Tomo, I., Wang, J., Waltzek, T., Wellehan, J.F. (2014). *Cetacean Morbillivirus*: Current knowledge and future directions. *Viruses* 6, 5145-5181.
– Van Elk, C.E., Van de Bildt, M.W., Jauniaux, T., Hiemstra, S., Van Run, P.R., Foster, G., Meerbeek, J., Osterhaus, A.D., Kuiken, T. (2014). Is *Dolphin Morbillivirus* virulent for white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris*)? *Vet. Pathol.* 51, 1174-1182.
– West, K.L., Rotstein, D., Robertson, K.M., Dennison, S., Levine, G., Davis, N., Schofield, D., Potter, C.W., Jensen, B. (2013). A Longman's beaked whale (*Indopacetus pacificus*) strands in Maui, Hawaii, with first case of *Morbillivirus* in the central Pacific. *Marine Mamm. Sci.* 29, 767-776.
– West, K.L., Levine, G., Jacob, J., Jensen, B., Sanchez, S., Colegrove, K., Rotstein, D. (2015). Coinfection and vertical transmission of *Brucella* and *Morbillivirus* in a neonatal sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in Hawaii, USA. *J. Wildl. Dis.* 51, 227-232.
– Wyss-Fluehmann, G., Zurbriggen, A., Vandevelde, M., Plattet, P. (2010). *Canine Distemper Virus* persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. *Acta Neuropathol.* 119, 617-630.

LA MALATTIA ALEUTINA DEL VISONE: MODELLO SPONTANEO PER LO STUDIO DELLE ARTERITI DA IMMUNOCOMPLESSI NELL'UOMO

FRANCO GUARDA

Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, 'Università degli Studi di Torino.

La malattia aleutina del Visone (*Mustela vison*) è una malattia lenta e persistente provocata da parvovirus che colpisce prevalentemente gli animali con un gene recessivo determinante la colorazione zaffiro del mantello (Porter *et al*., 1973).

Dal punto di vista epidemiologico è importante l'animale infetto, clinicamente silente, con viremia persistente, che assume il ruolo di elimnatore (Scatozza, 1995).

Anatomo-patologicamente le alterazioni sono caratterizzate da arterite nei vari organi (cuore, fegato, apparato gastroenterico, cervello, rene, e polmone, con polmonite interstiziale, glomerulonefrite e proliferazione plasmacellulare nei vari apparati).

In particolare sono molto interessanti le arteriti presenti nei vari tessuti, e soprattutto nel cuore, nei muscoli e nel rene (Leader *et al*., 1963; Porter e Larsen, 1964; Henson *et al*., 1966).

Nelle arterie lese (Leader *et al*., 1963; Henson *et al*.,1966) sono stati localizzati immunocomplessi nella parete (Porter *et al*., 1969). Anche a carico del rene gli animali infetti sviluppano una grave glomerulonefrite da immunocomplessi (Kindig *et al*., 1967; Porter *et al*., 1969; Pan *et al*., 1970).

Le arterie colpite presentano, nell'evoluzione acuta, vacuolizzazione cellulare senza proliferazione endoteliale, ma con numerosi granulociti neutrofili sulla superficie interna. Nella media si osserva necrosi fibrinoide con residui necrotici, leucociti e la scomparsa della lamina elastica interna. L'avventizia è massivamente infiltrata da cellule flogistiche, quali plasmacellule, leucociti e linfociti (Porter *et al*., 1973).

Nelle arteriti subacute la flogosi è costituita da una marcata proliferazione endoteliale che talvolta oblitera il lume vascolare. La membrana elastica interna è alterata e spesso è scomparsa (Porter *et al*., 1973).

La necrosi fibrinoide è sempre presente nella tonaca media con gravità variabile. Altrettanto l'avventizia è fortemente infiltrata da una reazione infiammatoria costituita da linfociti e plasmacellule.

Dal punto di vista immunoistochimico nella necrosi fibrinoide sono presenti immunocomplessi e C3. Anche nell'avventizia la flogosi plasmacellulare è caratterizzata dalla presenza di immunocomplessi. Gli antigeni virali sono presenti negli stessi loci degli immunocomplessi e del C3.

In conclusione, nei visoni infetti le piccole e medie arterie presentano sempre lesioni flogistiche.

Lo spettro delle alterazioni vascolari nella malattia aleutina del visone è fondamentalmente simile a quello della panarterite nodosa dell'uomo (Arkin, 1952; Zeek,1952) e degli animali, anche se nella malattia aleutina l'arterite contiene spesso cellule mononucleate, assenti per lo più nella panarterite nodosa.

Nei visoni infettati sperimentalmente sono presenti granulociti polimorfonucleati che dopo 48 ore sono rimpiazzati da cellule mononucleate (Poster *et al*., 1972).

Inoltre l'arterite dei visoni è molto simile alla malattia sperimentale da siero nell'uomo (Kniker e Cochrane,1968) sia nella morfologia sia nella distribuzione nelle arterie. Altrettan-

to i depositi di immunocomplessi e C3 sono del tutto simili a quelli riscontrati nella malattia da siero e nella panarterite nodosa dell'uomo (Mellors e Ortega, 1956).

Pertanto nella malattia cronica aleutina dei visoni anche le arteriti possono essere classificate come flogosi da immunocomplessi, come già era noto per le glomerulonefriti nella stessa malattia. Le arteriti della malattia aleutina è pertanto un interessante esempio di lesioni arteriose da immunocomplessi indotte e delle malattie da virus croniche e persistenti.

Nell'uomo la panarterite nodosa è spesso presente in pazienti che hanno superato infezioni da virus dell'epatite B e che sono portatori di antigene Australia, con un'abnorme risposta immunitaria contro l'antigene Au dell'epatite (Thiene, 1988).

Infine è risaputo che molti virus possono causare vasculite con proliferazione dell'intima, come per esempio l'arterite infettiva dell'equino, e analogamente i citomegalovirus possono causare lesioni analoghe nelle arterie (Jones *et al*., 1957).

Bibliografia

- Henson JB, Gorham JR, Padgett GA, Davis WC: Pathogenesis of the glomerular lesion in Aleutian disease of mink: immunofluorescent studies. Arch. Pathol. 87: 21-28, 1969.
- Jones TC, Doll ER, Bryans JT: The lesion of equine viral arteritis. Cornell. Vet. 47:52-68, 1957
- Kindig D, Spargo B, Kirsten WH: Glomerular response in Aleutian disease of mink. Lab. Invest.16:436-443, 1967.
- Leader RW, Wagner BM, Henson JB, Gorham JR: Structural and histochemical observations of liver and kidney in Aleutian disease of mink. Am. J. Pathol. 43: 33-53, 1963.
- Pan IC, Tsai KS Karstad L: Glomerulonephritis in Aleutian disease of mink. Immunofluorescent studies. J. pathol.101: 119-127, 1970
- Porter D., Larsen AE e Porter G (1973).Pathagenesis of Aleutian disease of mink. Amer. J. Path. 71,1973.
- Porter DD, Larsen AE, Porter HG: The pathogenesis of Aleutian disease of mink. I. In vivo viral replication and the host antibody response to viral antigen. J Exp Med 130:575-593, 1969.
- Porter DD, Larsen AE: Statistical survey of Aleutian disease in ranch mink. Am. J. Vet. Res. 25. 1226-1229, 1964
- Porter DD, Porter HG, Deerhake BB: Immunofluorescence assay for antigen and antibody in lactic dehydrogenase virus infection of mice. J. Immunol. 102: 431-436, 1969
- Scatozza F. (1995) in Malattie infettive degli animali UTET, Torino, 1995
- Thiene G. (1988) in Calì A., Fiore- Donati L.- Anatomia patologica Vol. 1, Firenze, 1988

MARMOTA MONAX (WOODCHUCK), MODELLO ANIMALE PER RICERCHE SULLA PATOGENESI, SULL'EVOLUZIONE E SULLE TERAPIE DELL'EPATITE B

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Tassonomia, areale geografico e biologia di *Marmota monax*

Marmota monax, soprannominata *groundhog*, *land beaver*, *mouse bear* nelle diverse regioni in cui vive - è una delle 14 specie di marmotta appartenenti al genere *Marmota* (Famiglia: *Sciuridae*, Ordine: *Rodentia*; Linneo, 1758). Nella catena montuosa degli Appalachi, che si sviluppa per circa 2500 km, parallelamente alla costa atlantica nord americana, dal golfo del fiume San Lorenzo fino all'Alabama, nell'isola di Terranova (Canada) e nelle vicine isole Saint-Pierre e Miquelon, nell'omonimo arcipelago (Collettività Territoriale d'Oltremare – Francia), è chiamata anche w*histle-pig* ed è così popolare, che un brand di whiskey porta il suo nome (*WhistlePig - Straight Rye Whiskey*). Il suo soprannome più diffuso, particolarmente nelle regioni orientali degli Stati Uniti, è (*Eastern*) *woodchuck*, di origine incerta e di oscuro significato, nulla avendo a che fare con *wood* e *chucking wood*. Molto probabilmente, ha un'etimologia popolare che deriva da *wuchak*, termine con il quale i Narragansett, tribù indiana di lingua algonchina stanziata nel Rhode Island e nel New England, chiamavano questa marmotta, poi "tradotto" dai coloni inglesi, per allitterazione, in *woodchuck,* termine che forse ricordava loro, in qualche modo, l'habitat tipico in cui vive questa marmotta. Alcuni, invece, individuano nelle parole algonchine *ocek* (pronuncia *oo-check*) o *ockquutchaun-nug* l'etimologia più probabile del termine "*woodchuck*". *Marmota monax* vive in nord America, nei territori che, dall'Alaska centro-orientale e dalla costa canadese del Pacifico, si estendono verso est, a cavallo dei Grandi Laghi e del confine tra Canada e Stati Uniti, fino alle regioni centrali della costa atlantica di questi ultimi (fig. 1).

Ha zampe posteriori corte e forti e grossi artigli, robusti e ricurvi, particolarmente adatti a scavare tunnel sotterranei e a costruire la tana, impresa nella quale spende buona parte della sua vita attiva, quando non iberna. Le orecchie, dai padiglioni auricolari arrotondati, possono chiudere il canale auricolare per proteggere l'orecchio interno dall'entrata di fango e detriti, durante l'attività di scavo (Harrington, 2014).

La pelliccia, brizzolata, è grigio-brunastra e sembra "gelata" o "brinata", effetto ottico dovuto alla presenza di due mantelli separati e sovrapposti: un folto sottopelo grigio, ricoperto da una pelliccia di pelo più lungo, costituita da striature di ruvido crine protettivo, di colore dal biondastro-marrone al marrone scuro,

Fig. 1. Marmota monax (da: Wikipedia)

Fig. 2. *Marmota monax* di sentinella a un gruppo di tane (da: Wikipedia)

mentre il colore della pelliccia che copre il ventre va dal biancastro-color camoscio al grigiastro-marrone (figg. 1,2). Il corpo, tozzo, compatto e robusto, poggia su zampe corte e forti e la coda è ricoperta da una folta pelliccia marrone scuro. Il dimorfismo sessuale riguarda essenzialmente le dimensioni: il maschio, poco più grande della femmina, ha massa corporea di 2,2-4,4 kg, ed è lungo 40-65 cm, coda compresa (10-18 cm), ma in habitat con pochi predatori, può arrivare fino a 14 kg e 80 cm. A differenza di altri sciuridi, ha spina dorsale curva, come quella delle talpe, altre grandi scavatrici di cunicoli. Come molti roditori, anche i *woodchuck* hanno incisivi bianchi o bianco-avorio, simili a robusti scalpelli; gli occhi, le orecchie e il naso, tozzo, sono nella parte alta del capo, grosso e appiattito, consentendo loro di rimanere nascosti all'interno del tunnel, presso l'entrata, senza esporsi mentre controllano la presenza di eventuali pericoli nei pressi della tana. Sebbene siano piuttosto lente nella corsa, queste marmotte, quando si sentono minacciate da un pericolo incombente, tornano veloci, con un'agilità sorprendente in questi animali piuttosto goffi, alle loro tane, dalle quali non si allontanano mai molto (Bollengier, 1994).

L'habitat tipico preferito dai *woodchuck* è il terreno agricolo aperto e le aree adiacenti, boscose o cespugliose. Le tane sono generalmente scavate in campi, pascoli e in aree boschive un po' elevate, lungo filari, recinzioni, muri di pietre, margini di strade, presso corsi d'acqua o nelle adiacenze di costruzioni - la cui stabilità può venire compromessa - o alla base di piante, in campi o praterie erbose. Le tane sono facilmente individuabili grazie alla terra di riporto accumulata all'entrata principale, che ha un diametro di 25-30 cm; ci sono almeno due, ma spesso più, accessi per ogni unità abitativa, che consta in un'ampia tana, tenuta sempre pulita, e relativi cunicoli.

Marmota monax è prevalentemente erbivora e si nutre, in prima mattina e nel pomeriggio, di vegetali, erbe e legumi, ma preferisce soia, fagioli e fave, piselli, carote e bacche, erba medica e trifoglio - e ciò la rende particolarmente invisa ai coltivatori - ma non disdegna, all'occorrenza, di nutrirsi di bruchi, cavallette, insetti e lumache (Bollengier, 1994; Whitaker, 1998); ingerisce quotidianamente una quantità di cibo pari a circa un terzo del suo peso corporeo.

In ogni colonia, uno o due individui stanno ritti sulle zampe posteriori nei pressi delle tane (fig. 2), in perenne allerta e, in caso di pericolo, emettono un fischio di allarme acuto e prolungato, prima di rifugiarsi nella tana (da qui il soprannome *whistle-pig* e Whistler, famosa località montana, sede olimpica, in Columbia Britannica, CND).

Principali nemici e predatori di *Marmota monax,* soprattutto degli esemplari più giovani, essendo quelli adulti grossi e robusti, sono le linci rosse, gli orsi, le volpi, le donnole, i serpenti a sonagli, i lupi, i coyote, i grandi falchi e… le automobili. Per scavare la tana e i cunicoli annessi, lunghi anche 15 metri, alla profondità di 1,5-2 metri, questa marmotta rimuove fino a 2,5 tonnellate (1 m^3) di terra; spesso, scava tane separate: quelle per l'inverno, più in profondità di quelle estive, sono sotto il livello delle temperature di congelamento del terreno.

Minacciati da predatori, i *woodchuck* si rivelano eccellenti scalatori di alberi e ottimi nuotatori; talora, acquattati sui rami più bassi delle piante, si soffermano a sorvegliare i vicini.

I maschi, poli-monogami, si accoppiano in marzo-aprile e trascorrono con la femmina una luna di miele che dura fino al parto, momento in cui abbandonano la tana. Le femmine partoriscono, dopo 30-32 giorni di gravidanza, 2-6 piccoli, privi di pelo e ciechi fino alla 4^ settimana di età, che vengono svezzati a fine giugno-inizio luglio. L'aspettativa di vita, che in natura è di 3-6 anni, è molto maggiore in cattività: *Wiarton Willie*, *woodchuck* maschio vissuto a Wiarton (Ontario, CND), è accreditato di aver raggiunto i 22 anni di età (Chapman, 1982; *Woodchuck Marmota monax*. North Caroline Wildlife, 1997; Whitaker, 1998; Light, 2009; Hinterland Who's Who ("Canadian Wildlife Service: Mammals: Woodchuck") 2011).

Grazie alla sua instancabile attività di scavo, *Marmota monax* ha portato alla luce un sito archeologico, l'Uffermann Site, sede principale della *Cole culture* (800-1300 d.C., tardo periodo della *Woodland culture,* 1000 a.C. - 1000 d.C.), nella contea di Delaware, presso Delaware Lake (Ohio). Rimuovendo in profondità le stratificazioni di soffice terreno che ricopriva questo sito archeologico, i *woodchuck* hanno portato in superficie numerosi reperti, testimonianze di una civiltà precolombiana: ossa umane e di animali, ceramiche finemente dipinte, utensìli di pietra e manufatti di cuoio (Owen, 1999).

Marmota monax è tra i pochi mammiferi che cadono in una vera ibernazione, simile a un coma profondo (letargo): la temperatura corporea scende fino a pochi gradi sopra il congelamento, le frequenze cardiaca e respiratoria crollano quasi a zero (4 battiti/min e 1 respiro/min), il flusso sanguigno è ridotto, perchè il sangue fluisce molto lentamente. I *woodchuck* sono essenzialmente solitari e intrattengono rapporti sociali limitati. A differenza di altre specie del genere *Marmota*, ibernano singolarmente, secondo un *pattern* di ibernazione simile a quello delle marmotte alpine (*Marmota marmota*), ma i loro *hibernacula* sono meglio isolati, termicamente, di quelli delle specie che vivono in habitat alpini. L'ibernazione dura da 3 a 6 mesi: inizia a fine ottobre-inizio novembre, quando massa corporea e spessore del pannicolo adiposo sottocutaneo, accumulati nei mesi precedenti, raggiungono il massimo sviluppo, e termina a fine febbraio-inizio marzo, ma date e durata variano molto con la latitudine. I maschi, dimagriti drasticamente (-47% della massa corporea), escono dall'ibernazione circa una settimana prima delle femmine (-37%) e degli individui più giovani.

Una leggenda, nata il 4 febbraio 1841 a Morgantown (PA), vuole che i *groundhog* escano dall'ibernazione il 2 febbraio di ogni anno. Questa ricorrenza, chiamata *Groundhog Day*, fu celebrata per la prima volta nel 1886 a Punxsutawney (PA). I beniamini di queste feste sono *Wiarton Willie*, a Wiarton (Ontario), *Punxsutawney Phil* in Pennsylvania (una leggenda vuole che sia ultracentenario!) e *Jimmy the Groundhog*, a Sun Prairie (Wisconsin). *Woodchuck* famosi nel sud degli USA sono *Smith Lake Jake* (Gransville, AL) e *General Beauregard Lee* (Yellow River, Game Ranch, presso Atlanta, GA).

Marmota monax può essere allevata in cattività e, nonostante che la sua naturale aggressività possa creare qualche problema, è usata come modello animale in un ampio spettro di attività della ricerca biomedica, che vanno dagli studi sull'obesità e sul bilancio energetico, alle ricerche sulle funzioni metaboliche ed endocrine, dai meccanismi di controllo del sistema nervoso centrale, alle patologie cardiovascolari e cerebrovascolari e alla ricerca oncologica (Young, 1979). Ciò è stato possibile grazie alla messa a punto di metodi per l'allevamento, la

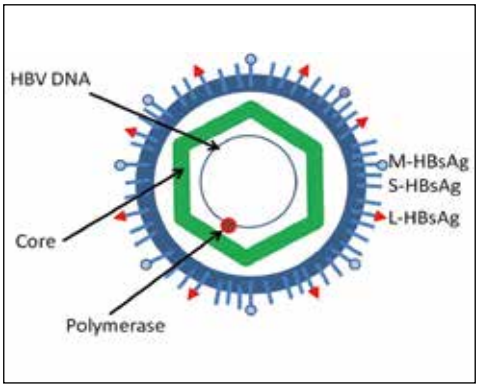


Fig. 3. *Woodchuck Hepatitis virus* (WHV, virus dell'epatire di *Marmota monax*) (da: en.wikipedia.org)

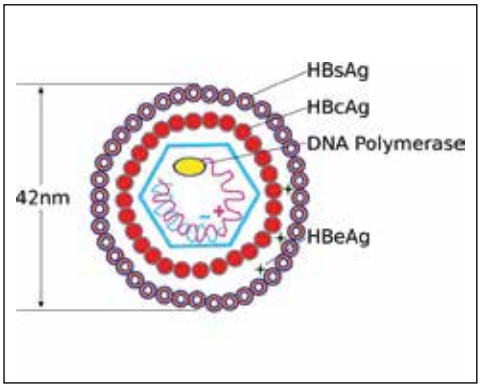


Fig. 4. *Human B virus* (HBV, human hepatitis B) (da: en.wikipedia.org)

cura e la gestione delle colonie di *woodchuck*, di tecniche di manipolazione, di somministrazione di farmaci, di costrizione, di induzione dell'anestesia e di prelievo di campioni biologici (sangue, urine, biopsie) (Young, 1979).

Ma il filone scientifico nel quale *Marmota monax* ha trovato, e ha tuttora, l'impiego più rilevante come modello animale di patologia, è la ricerca sull'epatite cronica B umana: infettata, in natura o sperimentalmente, con il *woodchuck hepatitis virus* (WHV) (fig. 3), sviluppa quasi nel 100% dei casi una patologia molto simile all'epatite B umana che, come quest'ultima, tende a evolvere in carcinoma epatocellulare (HCC).

Il woodchuck hepatitis virus (WHV)

WHV fu scoperto e descritto per la prima volta nel 1977, al Penrose Zoo di Philadelfia (PA) in una colonia di *woodchuck* che presentava un'elevata incidenza di individui affetti da epatite cronica e da HCC.

Vari ceppi di WHV sono stati identificati successivamente: strettamente correlati geneticamente tra loro, inducono, con diverse frequenze, infezioni croniche in marmotte neonate. La diffusione endemica del WHV nella popolazione selvatica di *Marmota monax* è rimasta a lungo poco studiata e non è del tutto chiarita.

L'infezione, diffusa nel sud-est della Pennsylvania e negli stati confinanti, è virtualmente assente negli stati di New York e di New England.

Durante un'indagine sierologica, sono stati raccolti e testati campioni ematici da 24 *woodchock* selvatici della Contea di Orange (North Carolina), per valutare la presenza di marker dell'infezione da WHV, in corso o pregressa. In 3 sieri (12,5%) sono stati riscontrati antigeni di superfice di WHV (WHsAg) e anticorpi contro l'antigene del suo *core* (WHcAg), *marker* di un'infezione attiva. Quattro sieri (17%) mostravano anticorpi contro WHcAg in assenza di antigeni WHsAg, indicando un'infezione pregressa; i rimanenti 17 sieri (70,5%) non presentavano *marker* rilevabili di infezione da WHV. Questi dati indicano che, in North Carolina, WHV è presente con un'incidenza sovrapponibile a quella rilevata in aree endemiche, quali le regioni centrali della costa atlantica degli Stati Uniti) (Cullen, 2008).

WHV è stato il primo degli *hepadnavirus* (*Hepa-DNA-virus*) di mammifero (famiglia *Hepadnaviridae*, genere *Orthohepadnavirus*) e di uccello (*Avihepadnavirus*) a essere descritto, dopo la scoperta del virus dell'epatite B umana (HBV) (fig. 4) fatta da Baruch S. Blumberg (1925-2011) nel 1965 (Nobel per la medicina 1976).

Gli hepadnavirus sono virus a DNA, con specifico tropismo per il fegato, piccolo capside sferico (40-48 nm) contenente *circular double-stranded* DNA, con una regione *single-stranded*.

Quasi tutti i w*oodchock* che diventano *carrier* cronici di WHV, dopo inoculo sperimentale del virus in età neonatale, sviluppano, progressivamente, una grave epatite che esita in un HCC entro i primi 2-4 anni di vita, epatite che presenta ciclo replicativo virale e lesioni epatiche incredibilmente simili a quelle riscontrate nell'infezione da HBV nell'uomo. L'aspettativa mediana di vita HCC-*free* di questi *woodchuck* è di 24 mesi, mentre l'aspettativa mediana di vita è di 30-32 mesi.

Il fatto che sia stato sperimentalmente provato che WHV evolve in HCC in *Marmota monax*, rafforza conclusioni basate su studi epidemiologici e di virologia molecolare, secondo i quali HBV è un fattore eziologico importante nell'epatocarcinogenesi umana.

All'inizio, gli studi sulla virologia e patogenesi dell'epatite B umana hanno coinvolto marmotte di cattura che avevano contratto l'infezione da WHV in natura. La ricerca condotta sui *woodchuck* selvatici è stata però condizionata negativamente dalla mancanza di sufficienti informazioni sul loro *background* (età, dieta alimentare, patologie spontanee in atto e pregresse, infezioni virali e batteriche, parassiti, esposizione a tossine ambientali, origine, inizio, durata dell'infezione da WHV, ceppo virale). Così è stato necessario fondare colonie di *woodchuck* nati in allevamenti attrezzati e con stabulari gestiti in condizioni controllate e standardizzate. Negli esperimenti finalizzati alla comprensione della virologia e dell'immunologia dell'epatite B umana, della patogenesi e del ruolo di HBV nell'epatocarcinogenesi, le marmotte nate e allevate in laboratorio sono risultate nettamente più idonee e affidabili di quelle di cattura.

WHV-*woodchuck*, modello animale dell'epatite cronica B umana

Woodchuck di allevamento, infettati in età neonatale con inoculi standardizzati di WHV, diventano al 100% WHV-*carrier* cronici: impiegati nella valutazione pre-clinica della terapia antivirale dell'infezione da HBV, forniscono risultati farmacocinetici e farmacodinamici in un modello animale di patologia umana ben caratterizzato, affidabile e robusto. Questo modello animale ha anche permesso di scoprire che il quadro tossicologico e delle lesioni epatiche, presenti nei *woodchuck* malati trattati con pirimidine fluorurate, è sovrapponibile a quello osservato nel paziente affetto da HBV e curato con gli stessi farmaci, dimostrando che queste marmotte rappresentano un potenziale rilevante anche nella valutazione pre-clinica della tossicità e tollerabilità dei farmaci antivirali (Tennant, 2001). Infatti, da quando questo modello è disponibile, tutti gli antivirali sviluppati contro HBV sono stati studiati in *Marmota monax* per valutarne la capacità di inibire la replicazione virale di WHV.

La valutazione dell'efficacia e tossicità delle molecole candidate, fatta nel processo di ricerca e sviluppo pre-clinico su *woodchuck carrier* cronici di WHV, è risultata predittiva delle risposte in pazienti portatori cronici di HBV (Menne, 2007a). In particolare, questo modello animale è stato utilizzato con successo nella valutazione di prodotti antivirali a base di analoghi nucleosidici della pirimidina, tradizionalmente usati per inibire la replicazione di HBV, e di modulatori delle risposte immunitarie, somministrati da soli o in associazione. Per ridurre i seri *side-effect* extraepatici indotti dalle terapie di lungo termine dell'epatite cronica B, questi farmaci sono stati coniugati con albumine galattosilate o lattosaminate (*carrier liver targeting*) che ne assicurano il trasporto selettivo verso gli epatociti e il rilascio controllato del

farmaco al loro interno. La selettività del *target* è assicurata dall'interazione dei residui galattosidici del *carrier* con il recettore di membrana dell'asialoglicoproteina, presente con alta densità e affinità solo sugli epatociti, che media l'endocitosi del complesso farmaco-albumine galattosilate. Entrati nelle cellule epatiche, questi farmaci complessati vengono indirizzati ai lisosomi, dove enzimi scindono il legame del complesso, liberando il principio attivo, che viene così a trovarsi con elevata biodisponibilità praticamente solo negli epatociti.

La validità di questo modello di strategia chemioterapica messo a punto nel *woodchuck* è stata confermata da studi clinici. Vidarabina (adenina-5'-arabinoside monofosfato, Ara-AMP) (fig. 5), coniugata con albumina serica umana lattosaminata, è stata somministrata per 28 giorni a pazienti affetti da epatite cronica B, mostrando la stessa attività antivirale di Ara-AMP non coniugata, ma senza indurre i *side-effect* clinici, tra i quali è compresa la grave neurotossicità, causati dal farmaco libero (Fiume,1997).

I risultati di una ricerca su *woodchuck* portatori di WHV confermano il valore e la predittività di questo modello animale. Diciannove marmotte, infettate cronicamente con WHV, sono state trattate con Ara-AMP o con aciclovir (acilguanosina monofosfato, ACVMP) (fig. 10) somministrati sia sotto forma di molecole libere sia come molecole coniugate con albumina serica umana lattosaminata. I livelli circolanti di WHV, invariati negli animali non trattati (controlli) e in quelli trattati col solo *carrier*, sono calati consistentemente dopo 5 giorni di trattamento sia con Ara-AMP libera (10 mg/kg/die), sia coniugata (0,75 mg/kg/die), e sia con ACVMP libera (20 mg/kg/die) sia coniugata (2,6 mg/kg/die).

Questi risultati dimostrano che i dosaggi di Ara-AMP e ACVMP, necessari per inibire viremia e replicazione di WHV, possono essere drasticamente ridotti, indirizzando selettivamente agli epatociti i due farmaci coniugati con albumina serica lattosaminata, strategia che mantiene l'efficacia e riduce la tossicità sistemica (Ponzetto, 1991).

Analoghi nucleosidici fluorurati della pirimidina

Vari analoghi nucleosidici della pirimidina, studiati in trial clinici per il trattamento dell'infezione cronica di HBV, sono stati sottoposti a test contro la replicazione di WHV in *woodchuck* infettati cronicamente, per raffrontare la loro efficacia relativa nell'uomo con quella nella marmotta.

Vidarabina (fig. 5), ribavirina (fig. 6), lamivudina (fig. 7) e famciclovir (*prodrug* di penciclovir) (fig. 8) hanno inibito, nel *woodchuck*, viremia e replicazione intraepatica del WHV-DNA in modo consistente con la loro efficacia relativa nei trial clinici su pazienti affetti da HBV. Zitovudina (AZT) (fig. 9), inattiva in questi pazienti, non ha inibito la replicazione di WHV neppure nel *woodchuck*.

Questi risultati sperimentali indicano, nell'infezione cronica da WHV nel *woodchuck*, un modello accurato e predittivo per lo studio di terapie antivirali contro l'infezione cronica da HBV nell'uomo e forniscono una base di riferimento per il confronto dell'efficacia antivirale di nuovi agenti antivirali sperimentali nel *test system* WHV-*woodchuck* (Korba, 2000).

La predittività del modello WHV-*Marmota monax* nella valutazione di terapie antivirali contro l'epatite da HBV è stata ulteriormente confermata in un esperimento in cui l'attività antivirale di clevudina (Revovir®) (fig. 11), analogo nucleosidico della pirimidina: [1-(2-fluoro-5metil-β,L-arabinofuranosil) uracile], si è dimostrata efficace contro HBV e ha inibito la replicazione del virus dell'epatite B dell'anatra in colture cellulari e la replicazione del virus dell'epatite B in anatre di Pechino infettate acutamente. *Woodchuck carrier* cronici di WHV hanno ricevuto, per 4 settimane, una singola somministrazione orale giornaliera di clevudina. Il trattamento ha ridotto significativamente, e in modo dose-dipendente, viremia, antigenemia, replicazione intraepatica di WHV ed espressione intraepatica dell'antigene WHcAg. Alla dose

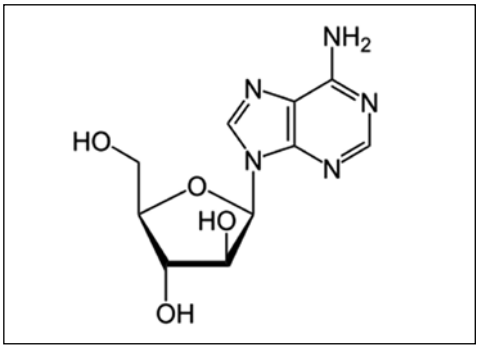


Fig. 5. Vidarabina

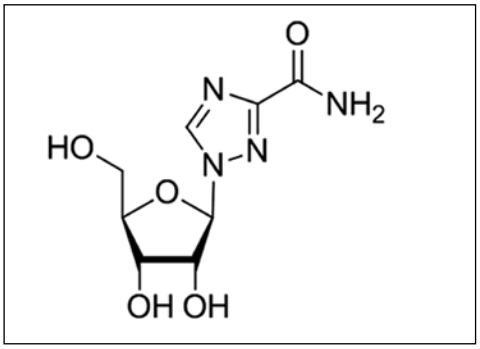


Fig. 6. Ribavirina

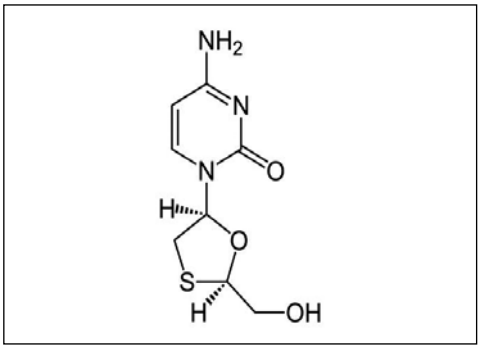


Fig. 7. Lamivudina

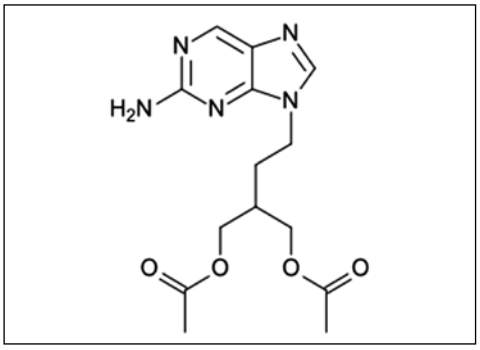


Fig. 8. Famciclovir

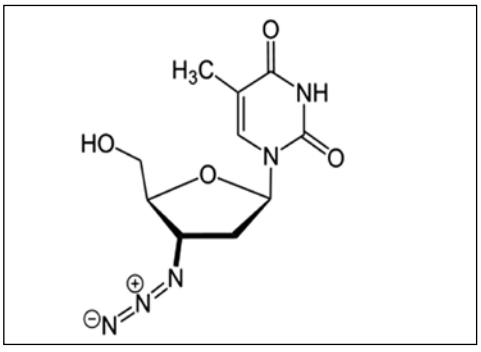


Fig. 9. Zitovudina

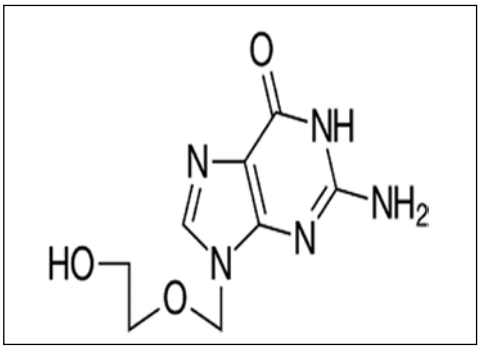


Fig. 10. Aciclovir

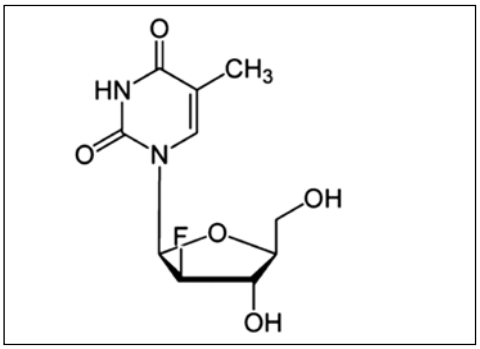


Fig. 11. Clevudina

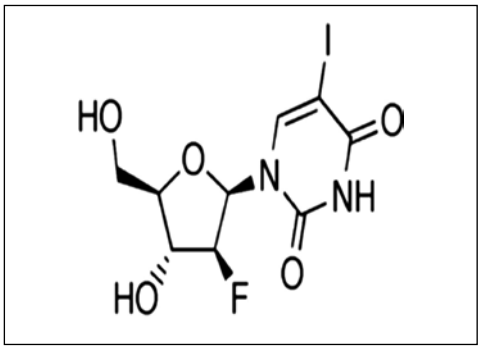


Fig. 12. Fialuridina

maggiore somministrata (10 mg/kg/die) sono state osservate anche riduzioni significative dei livelli di WHV-RNA e di (ccc)WHV-DNA (*covalently closed circular* WHV-DNA). L'abbattimento dose-dipendente della viremia è stato marcatamente rapido ai dosaggi maggiori di clevudina, con riduzioni dei livelli serici di WHV-DNA di oltre 3 Log, già dopo solo 2-3 giorni di terapia. Nel 50% almeno degli animali trattati con la dose maggiore, la viremia è rimasta significativamente soppressa per 10-12 settimane dopo la sospensione della terapia, mentre negli altri gruppi sperimentali trattati col farmaco si è osservato un ritardo dose-correlato del rimbalzo della viremia. Non sono state rilevate evidenze di tossicità dose-dipendenti riferibili al trattamento. Questi risultati indicano in clevudina (fig. 11) un candidato anti-*hepadnavirus* estremamente efficace nella terapia antivirale di breve-medio termine contro l'infezione cronica da HBV, privo di specifici eventi avversi (Peek, 2001).

Trial clinici di breve termine hanno confermato, in pazienti affetti da epatite B, la potente e sostenuta attività antivirale di clevudina contro HBV, in assenza di effetti tossici significativi riferibili alla terapia. La scarsità di eventi avversi sembrava giustificata dall'assenza di citotossicità e di alterazioni della funzione mitocondriale (Seok, 2009). Troppo tardi si è scoperto che la terapia a lungo termine con clevudina, in uso terapeutico da qualche anno, può indurre, in alcuni pazienti affetti da epatite B cronica, la deplezione del DNA mitocondriale, con conseguente miopatia mitocondriale associata a mionecrosi. Gli aspetti clinici e patologici della grave sindrome rabdomiolitica, riscontrata in 7 di questi pazienti, sviluppata durante un trial clinico di lungo termine con clevudina, sono stati studiati a fondo, prendendo in considerazione dati demografici, evidenze cliniche, risultati patologici e indagini a livello molecolare. Tutti i 7 pazienti erano stati curati per 8-13 mesi con clevudina e tutti presentavano, come sintomatologia più grave, debolezza muscolare prossimale lentamente progressiva, nel coso di parecchi mesi. Elevati livelli ematici di creatina-chinasi (*marker* di danneggiamento/sofferenza delle fibre muscolari) e il quadro miopatico, risultante dall'elettromiografia, indicavano in una grave forma di miopatia scheletrica la causa della crescente debolezza muscolare denunciata da questi soggetti, diagnosi confermata da biopsie muscolari, che evidenziavano una forma severa di mionecrosi associata a numerose fibre muscolari rosse sfilacciate, fibre negative alla citocromo-C ossidasi e una predominante atrofia delle fibre muscolari di tipo II (*fast-twitch*: caratterizzate da tempi di contrazione rapidi e da rapido affaticamento). Studi a livello molecolare con PCR quantitativa, su biopsie della muscolatura di questi pazienti, indicavano una grave deplezione del DNA mitocondriale nei muscoli scheletrici. L'evidenza che

la terapia di lungo termine con clevudina può indurre una miopatia mitocondriale associata a mionecrosi, impone un'accurato monitoraggio clinico, supportato da approfonditi e frequenti controlli di laboratorio, dei pazienti affetti da epatite cronica B in terapia di lungo termine con questo farmaco o con altri analoghi fluorurati della primidina (Seok, 2009).

Un tragico incidente…

Un altro farmaco di questa classe chimica, la fialuridina ([1,-2'desossi-2'fluoro-1-β-*d*-arabinofuranosil-5-iodo-uracile]) (fig. 12), è stata somministrata per 4 settimane a *woodchuck carrier* cronici di WHV. L'efficacia antivirale, che alla dose di 0,3 mg/kg/die i.p. era dubbia, a 1,5 mg/kg/die i.p. è risultata significativa e non accompagnata da effetti tossici, durante le 4 settimane di trattamento e nel *follow-up* post-trattamento (Tennant, 1998).

In un secondo esperimento, fialuridina è stata somministrata (1,5 mg/kg/die os) per 12 settimane a *woodchuck carrier* di WHV. Dopo 4 settimane di somministrazione, la concentrazione serica di WHV-DNA era inferiore di 2-3 Log a quella dei controlli (placebo) e non era più rilevabile, con dot-blot convenzionale, dopo 12 settimane. Inoltre, gli intermedi replicativi del WHV-DNA epatico erano diminuiti di 100 volte e l'espressione epatica di WHcAg era marcatamente ridotta. Nessun segno di tossicità è stato osservato dopo 4 settimane di trattamento, ma, dopo 6-7 settimane, è stato registrato un calo dell'assunzione di cibo e, dopo 8 settimane, il peso corporeo delle marmotte trattate era significativamente inferiore al peso dei controlli. Anoressia, perdita di peso, deperimento organico, devastazione della muscolatura scheletrica e letargia si sono progressivamente aggravati, tanto che tutte le marmotte trattate con fialuridina sono morte, o sono state sottoposte a eutanasia, tra il 78° ed il 111° giorno dall'inizio della terapia (Tennant, 1998). Insufficienza epatica (iperbilirubinemia, calo del fibrinogeno nel siero, elevato tempo di protrombina), acidosi lattica e steatosi epatica erano i sintomi caratteristici degli stadi finali della tossicità indotta da fialuridina.

La sindrome di tossicità epatica ritardata, registrata in *Marmota monax,* era molto simile, a quella precedentemente osservata in pazienti sotto terapia con questo farmaco, che allora era in fase sperimentale, e con altre molecole della stessa classe chimica (la già citata clevudina e la lamivudina ([(-)β-L-2'-3'-didesossi-3'-tiacitidina], Epivir®, potente inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa). Fialuridina era stata ampiamente studiata, durante il processo di R&D non-clinico, in ben 4 specie animali, seguendo i protocolli e le richieste regolatorie, allora vigenti, emanate dall'FDA, senza che emergessero sintomi di tossicità epatica. Inoltre, due sperimentazioni cliniche di breve termine con questo farmaco non avevano evidenziato alcun effetto tossico.

In base a questi risultati non-clinici e clinici favorevoli, l'NIH ha programmato e condotto questa sperimentazione di Fase II con fialuridina in pazienti affetti da epatite cronica B, della durata di 6 mesi. Purtroppo, durante questo trial clinico (1992-1993) si registrarono esiti letali in 5 pazienti su 15 trattati, mentre altri 2 sopravvissero solo grazie al trapianto di fegato. La causa di questi esiti drammatici fu individuata in una grave e rara forma di tossicità ritardata - e inattesa, perché non evidenziata dalla sperimentazione non-clinica in un appropriato modello animale, che allora non era ancora disponibile - causata da insufficienza epatica fulminante associata a insufficienza renale e acidosi lattica: la messa a punto del modello WHV-*woodchuck* risale al 1998, 5 anni dopo questo incidente, Studi su epatoblasti in coltura permisero di identificare, in seguito, il meccanismo d'azione di questa grave tossicità ritardata. Fialuridina, e i suoi metaboliti, inibiscono la γ-DNA polimerasi, provocando alterazioni nella replicazione del DNA mitocondriale (mtDNA): l'incorporazione di analoghi multipli nel mtDNA, probabilmente adiacenti a posizioni di sequenze adenosiniche, ostacola l'allungamento della catena di DNA, con conseguente perdita di mtDNA, comparsa di difetti

ultrastrutturali nei mitocondri e accumulo di goccioline lipidiche nel citoplasma (Brahams, 1994; Lewis, 1996).

Questo tragico incidente, lungi da rappresentare una sconfitta della sperimentazione animale, ne ribadisce validità e indispensabilità. E ciò è tanto più vero se riferito al modello WHV-*woodchuck* che, messo a punto solo qualche anno dopo il grave incidente di cui si è detto, si è dimostrato essere: 1) predittivo di efficacia terapeutica contro l'infezione da WHV/HBV, 2) in grado di riprodurre fedelmente, in un modello animale, gli effetti tossici dei farmaci anti-HBV che possono insorgere nel malato in terapia di lungo termine con derivati nucleosidici della pirimidina, e 3) permette di studiare i meccanismi molecolari che mediano la tossicità ritardata di questa classe di farmaci.

Il modello WHV-*woodchuck* continua a giocare un ruolo centrale nella ricerca e sviluppo non clinici di farmaci nucleosidici/nucleotidici antivirali fluorurati di seconda e terza generazione. Studi appropriati, disegnati per evidenziare una tossicità ritardata, sono ormai diventati parte integrante dell'investigazione non-clinica regolatoria prevista per molecole candidate alla ricerca clinica.

Chemoimmunoterapia dell'epatite cronica

Il ruolo dell'infezione persistente da WHV e della carica virale, nella storia naturale dell'infezione e della progressione della patologia nei *woodchuck,* è ormai chiarito del tutto.

Recentemente, grazie a questo modello animale, è stata fatta nuova luce sul ruolo delle risposte immuni dell'ospite in questi processi naturali e sulla possibilità di manipolare terapeuticamente il sistema immunitario del portatore cronico di WHV/HBV per ridurre e/o ritardare le gravi sequele della patologia, per mezzo dell'induzione del fenotipo di *recovery*.

Il trattamento dell'infezione cronica da HBV nell'uomo potrebbe combinare potenti farmaci antivirali e vaccini terapeutici per superare la tolleranza immunologica (mancata risposta a un antigene indotta da una precedente esposizione a quello stesso antigene: quando i linfociti incontrano l'antigene possono essere attivati, dando origine a una risposta immunitaria, o inattivati/eliminati, dando luogo alla tolleranza immunologica) e indurre il fenotipo di *recovery* per proteggere il paziente dalla progressione della malattia.

La vaccinazione convenzionale di *woodchuck* infettati cronicamente da WHV suscita profili differenziali di risposta delle cellule T, in base al fatto che le marmotte siano state trattate, o no, con clevudina, che abbatte sia le cariche virali sia quelle antigeniche. Le risposte differenziali delle cellule T definiscono sia gli epitopi clevudina-dipendenti sia quelli clevudina-indipendenti delle regioni preS and S della proteina dell'*envelope* di WHV. Solo il trattamento combinato clevudina**+**vaccino convenzionale riporta terapeuticamente il profilo della risposta delle cellule T dei *woodchuck* infettati cronicamente a quello riscontrato nella vaccinazione profilattica e nel *recovery* dall'infezione acuta da WHV.

Questi risultati hanno implicazioni importanti per i meccanismi della tolleranza immunologica che operano nell'infezione cronica da HBV e suggeriscono che la chemoimmunoterapia combinata possa essere una strategia vincente nel trattamento dell'infezione cronica da HBV (Menne, 2007b).

I *woodchuck*, in natura, sono una specie *outbred*, di individui non consanguinei, non ben definita immunologicamente a causa della limitata disponibilità di marker specifici dell'ospite. Tuttavia, il recente sviluppo di alcuni test diagnostici che forniscono informazioni importanti sui *woodchuck,* offre opportunità sperimentali per ulteriori studi meccanicistici sugli indicatori degli esiti di infezioni contratte da marmotte neonate e adulte. La comprensione dei meccanismi virologici e immunologici responsabili della risoluzione di infezioni autolimitate, e dell'insorgenza e mantenimento di infezioni croniche, faciliterà notevolmente lo sviluppo di strategie per l'eradicazione dell'infezione cronica conclamata da HBV (Menne, 2007b).

Hepadnavirus-Marmota monax, oltre a rappresentare il modello animale di patologia umana di elezione per lo studio dell'infezione da HBV, fornisce informazioni su replicazione e "persistenza virale", contribuendo in modo determinante alla comprensione dei fenomeni legati alla progressione della patologia indotta da *Hepadnavirus*. La "persistenza virale" è quello stato, successivo a un periodo iniziale di infezione produttiva e alla risposta antivirale dell›ospite, nel quale il virus mantiene la capacità di replicare continuamente, o periodicamente, nell'ospite stesso, per un certo lasso di tempo. Lo sviluppo di tecniche raffinate di ultrasonologia rende possibile effettuare prelievi bioptici per determinare, parallelamente a rilevamenti istologici, l'evoluzione del danno epatico (Lisi, 2003).

Ricerche di biologia molecolare permettono di caratterizzare le diverse forme genomiche virali mentre, con l'individuazione di marcatori immunologici di *Marmota monax,* si può seguire lo sviluppo della risposta cellulomediata all'infezione.

E' stato possibile descrivere l'evoluzione della popolazione virale durante la fase acuta dell'infezione, definendo l'importanza dell'adattamento virale e dell'eterogeneità delle varianti (Argentini, 1999). Alcune classi di varianti, portatrici di delezioni nella regione PreS degli antigeni di superficie di WHV, sono risultate simili a quelle descritte in casi di infezione occulta da HBV e in pazienti con alterazioni del sistema immunitario (Rapicetta, 2002; La Sorsa, 2002).

Modello di HCC indotto da WHV e aspetti immunologici dell'epatite di *Marmota monax*

Il modello di HCC indotto da WHV nel *woodchuch* è stato utilizzato con successo anche nello sviluppo di nuovi agenti per l'*imaging* e per il potenziamento del rilevamento precoce di neoplasie epatiche per mezzo di *imaging* con ultrasuoni e risonanza magnetica (Lisi, 2003).

La chemoprevenzione di HCC, per mezzo di terapia di lungo termine a base di nucleosidi antivirali, è stata messa a punto nel *woodchuck* e "*proof of principal*" è stato stabilito per alcuni dei metodi molecolari innovativi per il trattamento dell'HCC (Tennant, 2004).

La storia naturale dell'infezione da WHV è stata studiata in una colonia di 38 *woodchuck*. Oltre alla valutazione dei *marker* sierologici di WHV, i risultati al microscopio ottico di 61 biopsie epatiche sono stati rapportati alle evidenze, ottenute con analisi in immunofluorescenza, di antigeni del nucleocapside (WHcAg) e di superficie (WHsAg) di WHV. Ventiquattro marmotte, *carrier* cronici di WHsAg, mostravano segni di continua replicazione virale. Le biopsie epatiche hanno evidenziato due principali quadri immunomorfologici: 1) un'epatite portale, nella quale WHcAg si accumulava nel citoplasma, mentre WHsAg era associato alla membrana degli epatociti e 2) un'epatite periportale, nella quale WHcAg si spostava verso una localizzazione nucleare, mentre WHsAg diventava, essenzialmente, intracitoplasmatico.

La progressione da epatite portale a epatite periportale, osservata in 7 marmotte, appariva indotta da un parziale ricupero della reattività immunitaria specifica a WHV, insufficiente, tuttavia, a interrompere la replicazione virale. Inoltre, depositi di WHsAg e di immunoglobuline sono stati riscontrati nei reni e nella milza di animali con una grave forma di epatite (Frommel, 1984).

In conclusione, il *woodchuck* portatore cronico di WHV è un importante, predittivo, ben caratterizzato e validato modello animale di patologia umana in un mammifero, per la valutazione pre-clinica della tossicità, sicurezza, tollerabilità ed efficacia di molecole candidate, di vaccini terapeutici sperimentali e di immunomodulatori per il trattamento e la prevenzione della sequela di patologie da HBV (Menne, 2007b).

Questo modello è ormai maturo e disponibile per ricerche di base avanzate sui meccanismi virali e molecolari responsabili dell'epatocarcinogenesi e potrebbe rappresentare un solido potenziale per lo sviluppo di strategie innovative per la chemoprevenzione e per la terapia genica dell'HCC nell'uomo (Tennant, 2004).

Bibliografia

- Argentini, C., La Sorsa, V., Bruni, R., D'Ugo, E., Giuseppetti, R., Rapicetta, M., 1999; *Hepadnavirus evolution and molecular strategy of adaptation in a new host*; J. Gen. Virol., 80: 617-626
- Bollengier, M. M. Jr., in *Prevention and Control of Wildlife Damage* (eds. Hyngstrom, E. E., Timm, R. M. & Larson, G. E.) B-183-187. University of Nebraska, Lincoln, NE, 1994
- Brahams, D., 1994; *Deaths in US fialuridine trial*; Lancet, 343: 1494-1495
- Chapman, J. A., Feldhammer, G. A., 1982; *Wild Mammals of North America, Biology, Management, Economics*. Johns Hopkins University Press. ISBN 0801823536
- Cullen, J. M., Lindsey-Pegram, Cote, P. J., 2008; *Serologic Survey of Woodchuck Hepatitis Virus in North Carolina Woodchucks* (*Marmota monax*) J. of Zoo and Wildlife Medicine, 39, 263-265
- L. Fiume, L., Di Stefano, G., Busi, C., Mattioli, A., Bonino, F., Torrani-Cerenzia, M., Verme, G., Rapicetta, M., Bertini, M., and Gervasi, G. B.,., 1997; *Liver targeting of antiviral nucleoside analogues through the asialoglycoprotein receptor*; (Review) J. of Viral Hepatitis, 4: 363-370
- Frommel, D., Crevat, D., Vitvitsky, L., Pichoud, C., Hantz, O., Chevalier, M.,Grimaud, J. A., Lindberg, J., and Trépo, C. G., 1984; *Immunopathologic aspects of woodchuck Hepatitis;* The Amer. J. of Pathology; 115: 125-134
- Harrington, M., 2014; *What a woodchuck would chuck*. Laboratory Animal Europe, vol. 14: p. 37
- Hinterland Who's Who ["Canadian Wildlife Service: Mammals: Woodchuck"]. Hww.ca. Retrieved on 2011-09-15
- Korba, B. E., Cote, P., Hombuckle, W., Tennant, B. C., Gerin, J. L., 2000; *Treatment of chronic woodchuck hepatitis virus infection in the Eastern woodchuck (Marmota monax) with nucleoside analogues is predictive of therapy for chronic hepatitis B virus infection in humans; Hepatology*, 31: 1165-1175
- La Sorsa, V., Argentini, C., Bruni, R., Villani, U., Giuseppetti, R., & Rapicetta, M., 2002; *In vivo transmission and dynamics of deleted genomes after experimental infection of woodchuck hepatitis B virus in adult animals;* Virus Genes, 25: 147-157
- Lewis, W., Levine, E. S., Griniuviene, B., Tankersley, K. O., Colacino, J. M., Sommadossi, J. P., Watanabe, K. A., Perrino, F. W., 1996; *Fialuridine and its metabolites inhibit DNA polymerase gamma at sites of multiple adjacent analog incorporation, decrease mtDNA abundance, and cause mitochondrial structural defects in culture hepatoblasts*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3592-3597
- Light, J. E. *"Animal Diversity Web: Marmota monax"*. University of Michigan, Museum of Zoology. Retrieved on 2009-07-14
- Lisi, D., Kondili, L. A., Ramieri, M. T., Giuseppetti, R., Bruni, R., Della Rocca, C., De Santis, A., and Rapicetta, M., 2003; *Ultrasonography in the study of hepatocellular carcinoma in woodchuck chronically infected with WHV*; Lab. Anim., 37: 233-240
- Menne, S. & Cote, P. J., 2007a; *The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection*; World J. Gastroenterology, 13, 104-124
- Menne, S., Tennant, B. C., Gerin2 J. L., and Cote, P. J., 2007b; *Chemoimmunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in the woodchuck model overcomes immunological tolerance and restores T-cell responses to pre-S and S regions of the viral envelope protein; J*. Virol., 81: 10614-10624
- Owen, L. K., ed., *Dictionary of Ohio Historic Places*. Vol. 1, St. Claire Shores: Somerset, 1999, p. 328

- Peek, S. F., Cote, P. J., Jacob, J. R., Toshkov, I. A., Hornbuckle, W. E., Baldwin, B. H., Wells, F. V., Chu, C. K., Gerin, J. L., Tennant, B. C., Korba, B. E, 2001*;Antiviral activity of clevudine [L-FMAU, (1-(2-fluoro-5-methyl-*β*, L-arabinofuranosyl) uracil)] against woodchuck hepatitis virus replication and gene expression in chronically infected woodchucks (Marmota monax)*; Hepatology, 33: 254-266
- Ponzetto A., Fiume, L., Forzani, B., 1991; *Adenine arabinoside monophosphate and acyclovir monophosphate coupled to lactosaminated albumin reduce woodchuck hepatitis virus viremia at doses lower than do the unconjugated drugs;* Hepatology, 14: 16-24
- Rapicetta, M., Ferrari, C., and Levrero, M., 2002*; Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infections*; J. Med. Virol., 67: 454-457
- Seok, J. I., and Lee, D.K., 2009; *Long-term therapy with clevudine for chronic hepatitis B can be associated with myopathy characterized by depletion of mithocondrial DNA*; Hepatology, 49: 2080-2086
- Tennant, B. C., Baldwin, B. H., Gtaham, L. A., Ascenzi, M. A., Hornbuckle, W. E., Rowland, P. H., Tochkov, I. A., Yeager, A. E., Erb, H. N., Colacino, J. M., Lopez, C., Engelhardt, J. A., Bowsher, R. R., Richardson, F. C., Lewis, W., Cote, P. J., Korba, B. E., Gerin, J. L., 1998; *Antiviral activity and toxicity of fialuridine in the woodchuck model of hepatitis B virus infection*; Hepatology, 28: 179-191
- Tennant, B. C. & Gerin, J. L., 2001; *The woodchuck model of hepatitis virus B infection*; ILAR J., 42: 89-102
- Tennant, B. C., Toshkov, I. A., Peek, S. F., Jacob, J. R., Menne, S., Hornbuckle, W. E., Schinazi, R. D., Korba, B. E., Cote, P. J., Gerin, J. L., 2004; *Hepatocellular Carcinoma in the woodchuck model of Hepatitis B Virus infection*; Gastroenterology, 127 (Suppl. 1): S283-S293
- Whitaker, J. O., Hamilton, W. J., *Mammals of the Eastern United States*. Cornell University Press, ISBN 0-8014-3475-0
- *Woodchuck*. *Marmota monax*. North Caroline Wildlife. Written by Perry Sumner. Illustrated by J.T. Newman. Produced January 1997 by the Division of Conservation Education, N.C. Wildlife
- Young, R. A., & Sims, E. A., 1979; *The woodchuck, Marmota monax, as a laboratory animal*. Lab. Anim. Sci.; 29, 770-780

SAGUINUS OEDIPUS, PRIMATE MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DELL'INFEZIONE DA VIRUS DI EPSTEIN-BARR

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Tassonomia, areale geografico e biologia di *Saguinus oedipus*

Il modello animale di patologia umana oggetto di questo articolo è *Saguinus oedipus* (ordine: *Primati*, famiglia: *Cebidi,* sottofamiglia: *Callitrichidae*, genere: *Saguinus*). Chiamato comunemente *tamarino edipo,* è una piccola scimmia del Nuovo Mondo che appartiene alla stessa famiglia di un altro piccolo primate, il *marmoset* (*Callithrix jacchus*), anch'esso usato nella ricerca biomedica.

Linneo descrisse per primo, nel 1758, *Saguinus oedipus* e chiamò questa specie *Simia oedipus*, cioè "scimmia dai piedi gonfi"; aggettivo del tutto gratuito, perchè i piedi di queste scimmie non sono né gonfi nè grandi. Ciò si spiega col fatto che Linneo era solito dare nomi mitologici alle specie che descriveva – in questo caso quello del mitico re di Tebe - anche senza un razionale specifico. Fino agli anni '80 del secolo scorso si pensava che *Saguinus oedipus* fosse diffuso dal Costa Rica alla Colombia settentrionale, ma dai primi anni '90 del secolo scorso lo si può trovare solo più nelle foreste tropicali del nord-ovest della Colombia. Soprattutto a causa della deforestazione intensiva, gli individui di questa specie vivono confinati in parchi (il *Paramillo Natural National Park*, con i suoi 4.600 km², è il più vasto) e in piccole riserve.

Saguinus oedipus (fig. 1), con un'altezza di circa 23 cm e un peso corporeo medio che non arriva ai 450 grammi, è il più piccolo primate conosciuto. Grazie alla rigogliosa criniera bianca sagittale, di pelo lungo e folto che, dalla fronte, sale a coprirgli la testa per scendere sulla nuca e sulle spalle, è anche chiamato *cotton-top tamarin* o *cotton-headed tamarin* (tamarino con chioma di cotone) e *Tití cabeza blanca*. Quando è allarmato o eccitato, *Saguinus oedipus* rizza la soffice e folta cresta bianca e si alza in piedi, per sembrare, pur nelle sue dimensioni minime, aggressivo e imponente. In netto contrasto con la candida chioma, ha la faccia coperta da pelo corto e nero, con strisce grigie o bianche sopra gli occhi; anche il corpo, eccettuate le palme dei piedi e delle mani, è ricoperto da pelo nero, screziato da bandeggiature grigio-brune o bianche. Questa scimmia non presenta dimorfismo sessuale, conduce vita arborea, diurna e altamente territoriale e, grazie a unghie simili ad artigli affilati, si arrampica sui tronchi e scorrazza sui rami, saltando agilmente di ramo in ramo, da un albero all'altro. Raggiunge la maturità verso i 16 mesi di età; nel suo habitat naturale vive in media 13-

Fig. 1. *Saguinus oedipus* (da: Wikipedia)

Fig. 2. *Saguinus oedipus* adulto con piccoli (da: leszoodanslemonde.com)

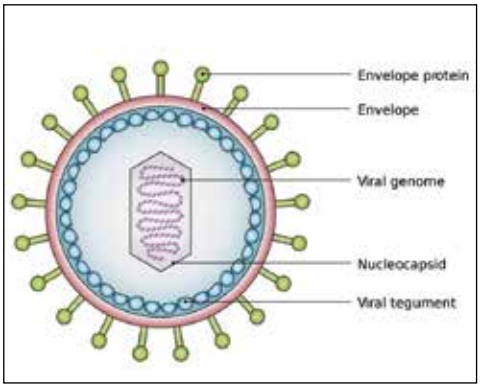


Fig. 3. Struttura del Virus di Epstein-Barr (da: en.wikipedia.org)

14 anni, e fino a 24 anni in cattività, in gruppi di 2-9 individui (Catching up with cotton-top tamarins, 2013). L'organizzazione sociale di *Saguinus oedipus* è quella tipica di un *cooperative polyandrous group*: all'interno dei gruppi c'è un'evidente dominanza gerarchica. Solo la femmina dominante si accoppia con due o più maschi, in una stessa stagione riproduttiva, mentre inibisce l'accoppiamento alle altre femmine del gruppo, con l'emissione di ferormoni. Il tasso di fertilità di queste scimmie è il più alto tra i primati: in media, le nidiate sono di 2-3 piccoli e, unici tra i primati, partoriscono regolarmente una o due coppie di gemelli dizigotici/anno (80% delle nascite) (David, 2009).

Durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale, sia nella specie *Saguinus oedipus* sia in quella *Callithrix jacchus*, si verifica un chimerismo che coinvolge solo la linea cellulare ematopoietica e permette lo scambio di cellule staminali tra le blastocisti gemelle (Sweeney, 2012). *Saguinus oedipus è* stato studiato a fondo per la varietà e l'elevato livello qualitativo dei suoi comportamenti sociali, collaborativi e altruistici ma, all'occorrenza, anche ostili e dispettosi.

Le femmine concepiscono di nuovo poche settimane dopo il parto e, poiché devono spendere energie nello stesso tempo per l'allattamento dei neonati e per la nuova gestazione, gli adulti del gruppo, parenti e non parenti, sono coinvolti nell'allevamento dei cuccioli, che vengono "adottati" (Zahed, 2010). Queste scimmie, capaci di un elevato livello di cure parentali, sono infatti molto disponibili, soprattutto nei confronti dei neonati e dei cuccioli, e mostrano dinamiche sociali e plasticità individuale nei comportamenti finalizzati alla cura della prole: i maschi adulti, il padre *in primis*, e poi i fratelli e le sorelle, a partire dai più anziani, cooperano nello svolgimento dei compiti parentali in modo collaborativo e mutualistico, trasportando i piccoli aggrappati sulla schiena (fig. 2) e procurando loro il cibo dopo lo svezzamento (Zahed, 2010). Si nutrono di frutta, insetti, gemme, piccole lucertole, anfibi e secrezioni vegetali. Rapaci, mustelidi, felini e serpenti sono i loro principali predatori. Usano un sofisticato sistema di comunicazione che, con 38 suoni distinti, non è privo di una semplice struttura grammaticale e non è ancora del tutto acquisito a 5 mesi di età. Studiosi del comportamento ritengono che alcuni richiami emessi da queste scimmie rappresentino una sintassi fonetica, mentre altri suoni rappresenterebbero una sorta di sintassi lessicale.

Tra la fine degli anni '60 ed i primi anni '70 del secolo scorso, non meno di 30-40.000 *Sa-*

guinus oedipus furono catturati ed esportati negli USA per essere usati nella ricerca biomedica (Savage, 2010).

Dal 1973 *Saguinus oedipus* è considerato specie a serio rischio di estinzione (*IUCN Red List of Threatened Species*), soprattutto a causa dell'estensiva distruzione delle foreste tropicali, suo habitat naturale. Nel 1976, il CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora,* nota anche come *Washington Convention*) pose queste scimmie sotto il più alto livello di protezione, vietandone il commercio. In base a una stima recente, si valuta che gli esemplari di *Saguinus oedipus* siano ormai ridotti a soli 6-7.500 (Savage, 2010). Nel 1985 è nato il *Titi Proyecto* per la conservazione di questa specie. Dal 1976, nella ricerca biomedica si usano solo individui allevati in cattività.

Patologie spontanee

In uno studio epidemiologico sulle patologie spontanee di esemplari di *Saguinus oedipus* nati e allevati in cattività, la colite è stata diagnosticata nel 21% dei soggetti esaminati (David, 2009). Questa patologia intestinale causa prolungati e ripetuti attacchi di diarrea, con forti perdite di peso corporeo, e può anche risultare letale. Poiché negli individui di questa specie la colite può comportare un accresciuto rischio di sviluppare un adenocarcinoma del colon, *Saguinus oedipus* è diventato un modello naturale per lo studio dell'insorgenza e dell'evoluzione di questa patologia spontanea e per lo studio di nuovi antitumorali.

Esemplari di *Saguinus oedipus* di allevamento sono usati, sempre più spesso, anche come modello animale per lo studio di altre patologie intestinali, come l'infezione causata dal virus di *Epstein-Barr* (EBV, o *Human Herpersvirus-4* [HHV-4]) (fig. 3). È, questo, un virus a DNA, isolato per la prima volta nel 1964 da Anthony Epstein e Yvonne Barr, che ha come unici ospiti l'uomo e qualche raro ceppo di scimmie antropomorfe. L'infezione da EBV può rimanere latente per tutta la vita nelle cellule immunitarie dell'ospite uomo: oltre il 90% della popolazione umana è portatrice sana di questo virus, contro cui sviluppa anticorpi specifici. Durante lo stato di latenza, il virus è sorvegliato dall'immunità umorale attiva (risposta immunitaria mediata dagli anticorpi prodotti dai linfociti B citotossici) e dal sistema dell'interferone, mentre il suo DNA rimane come episoma nel nucleo delle cellule infettate, senza integrarsi nel loro DNA.

L'infezione da EBV

L'infezione da EBV può essere contratta a diverse età: mentre è generalmente sintomatica nei bambini e nei ragazzi, nei giovani adulti può causare una mononucleosi infettiva (risposta immunitaria iperattiva, con accumulo nel sangue di linfociti B, monociti e linfociti T atipici o cellule di Downey).

L'infezione da EBV è stata messa in relazione alla patogenesi dei linfomi di Burkitt e di Hodgkin, e di alcuni tumori epiteliali (carcinoma indifferenziato del rinofaringe), patologie, queste, che si sviluppano in assenza di una risposta immunitaria efficace.

Il rapporto, scientificamente provato, tra l'infezione da EBV e il numero crescente di neoplasie umane, dà un'idea dell'importanza degli sforzi fatti per la prevenzione dell'infezione da parte di questo potenziale cancerogeno e alla messa a punto di modelli animali validati per lo studio dei tumori umani di origine virale.

Fino alla fine degli anni '80 del secolo scorso, la mancanza di modelli animali adatti ha creato serie difficoltà per la valutazione sperimentale di vaccini efficaci contro l'EBV. Il modello animale di patologia basato su *Saguinus oedipus* è stato determinante nel processo di

ricerca e sviluppo di un'efficace strategia vaccinale. Questa scimmia, infettata naturalmente da EBV o inoculata con una dose tumorigenica di EBV, sviluppa linfomi multifocali a grandi cellule, morfologicamente simili, sotto molti aspetti, a quelli riscontrati in pazienti trapiantati immunosoppressi. Questi linfomi ospitano particelle di EBV praticamente in tutte le cellule tumorali ed esprimono uno spettro di prodotti genici virali latenti simile a quelli di una linea cellulare linfoblastoide (linfociti B infettati e immortalizzati), caratteristiche che ne fanno un modello ideale di neoplasia indotta da EBV (Niedobitek,1994). Questo piccolo primate è diventato, così, il modello animale di patologia umana di elezione nella ricerca e nello sviluppo non solo di nuovi e più potenti vaccini contro l'EBV, ma anche di nuovi antitumorali contro le neoplasie causate da questo virus.

Negli ultimi 25 anni sono stati sviluppati alcuni vaccini basati sull'antigene virale gp340/220 - che è la principale glicoproteina della membrana lipoproteica che avvolge il capside dell' EBV (fig. 3) - efficaci nel prevenire, in questo modello sperimentale, lo sviluppo di linfomi riconducibili all'infezione da EBV.

Usando tecniche di *in situ hybridization* e immunoistologiche, l'infezione da EBV è stata caratterizzata in *Saguinus oedipus* non immunizzati e inoculati con un'elevata dose tumorigenica standard di EBV, che hanno sviluppato linfomi, e in altri *Saguinus oedipus* che, immunizzati col vaccino 2 settimane prima dell'inoculo della stessa dose di virus, non hanno sviluppato questa patologia (David, 2009). Negli animali infettati e non vaccinati, sono state trovate sporadiche cellule linfoidi infettate da EBV in alcuni organi non linfoidi, cellule che erano, ovviamente, più numerose in organi contenenti tessuti linforeticolari (linfoidi o linfatici), come l'intestino (Niedobitek,1994). Poichè EBV è capace di replicarsi nelle cellule epiteliali nella leucoplachia orale capelluta, lesione generalmente benigna che, talora, compare nel cavo orale di pazienti immunocompromessi (HIV/AIDS) o immunosoppressi (trapiantati), si è indagato se, anche in *Saguinus oedipus* infettati da EBV, si possono riscontrare forme di infezione litica nelle cellule della mucosa orale. Tecniche di immunoistochimica hanno escluso questa possibilità, in quanto non si è trovata traccia di replicazione virale nei tessuti mucosali di queste scimmie (Niedobitek,1994).

Sia nell'uomo che in *Saguinus oedipus*, quindi, l'infezione da EBV è largamente confinata nel compartimento delle cellule linfoidi, con la maggioranza di cellule portatrici di particelle virali appartenenti al fenotipo B. Sorprendentemente, un numero variabile di cellule EBV-positive, in maggioranza linfociti B, è stato trovato anche nelle scimmie immunizzate e protette contro lo sviluppo di linfomi indotti da EBV, mentre non si sono trovate cellule non linfoidi infettate (Niedobitek,1994). Questo risultato dimostra che, nel modello sperimentale di *Saguinus oedipus*, la vaccinazione con il vaccino contro l'antigene virale gp340/220 non induce un'immunità sterilizzante contro l'EBV, ma piuttosto rende l'animale capace di controllare l'infezione provocata da dosi tumorigeniche di questo virus e di prevenire lo sviluppo di linfomi. L'analisi dell'espressione genica virale in *Saguinus oedipus* immunizzati, condotta con tecniche immunoistochimiche e di in *situ hybridization*, fa pensare che la latenza virale, mantenuta nelle scimmie immunizzate, differisca da quella riscontrata nei linfomi indotti da EBV in quelle non immunizzate. Anche nei soggetti immunizzati, la protezione contro lo sviluppo di linfomi è, almeno in parte, cellulo-mediata (David, 2009).

Questi risultati suggeriscono che in esemplari di *Saguinus oedipus* immunizzati si instauri un'infezione latente da EBV non associata allo sviluppo di linfomi maligni, e che ciò possa verificarsi anche in quelle scimmie, non immunizzate, nelle quali i linfomi regrediscono spontaneamente, grazie allo sviluppo di un'immunità cellulomediata all'EBV.

Studi su animali immunizzati inducono a pensare che anche la protezione indotta dal vaccino contro lo sviluppo di linfomi causati da EBV sia, almeno in parte, cellulo-mediata. Sebbene la reazione all'infezione primaria da EBV, sia in esemplari di *Saguinus oedipus* immu-

nizzati sia in quelli non immunizzati ma sopravvissuti ai linfomi indotti dal virus, differisca da quella riscontrata nell'uomo, probabilmente esiste, in queste scimmie, una forma di latenza virale, simile all'infezione da EBV persistente nell'uomo.

In conclusione questi e altri risultati fanno di *Saguinus oedipus*, immunizzato e protetto contro lo sviluppo di linfomi indotti da EBV o esposto a dosi di virus sub-linfomageniche, un modello animale di patologia umana validato, particolarmente adatto allo studio dell'infezione a opera di questo virus oncògeno nell'uomo.

Bibliografia

- David J. M., Dick, E. J., JR., and Hubbard, G. B., 2009; Spontaneous pathology of the common marmoset (*Callitrix jacchus*) and tamarins (*Saguinus oedipus, Saguinus mystax*). J. Med. Primatol.; vol. 38: pp. 347-359
- Catching up with cotton-top tamarins. Lab. Animal Europe. 2013; vol. 13, n. 9: p. 36
- Niedobitek G., Agathanggelou, A., Finerty, S., Tierney, Watkins, P., Jones, E. L.,Morgan, A., Young, L. S. , and Rooney, N., 1994; Latent Epstein-Barr virus infection in cottontop tamarins. A possible model for Epstein-Barr virus infection in humans. Am. J. Pathol., vol. 145: pp. 969-978
- Savage A., Thomas, L., Leighty, K. A.,, Soto, L. H., and Medina, F. S., 2010; Novel survey method find dramatic decline of wild cotton-top tamarin population. Nat. Commun. 2010; vol. 1: p. 30
- Sweeney, C. G., Curran, E., Westmoreland, S. W., Mansfield, K. G., and Vallender, E. J., 2012; Quantitative molecular assessment of chimerism across tissues in marmosets and tamarins. BMC Genomics, vol. 13: pp. 98
- Zahed S.R., Kurian, A. V., Snowdon, C. T., 2010; Social dynamics and individual plasticity of infant care behavior in cooperatively breeding cottontop tamarins, Am. J. Primatol., vol. 72: pp. 296-306

AFFINITÀ PATOLOGICHE NELLE INFEZIONI CLAMIDIALI DELL'OVIDUTTO NEL BOVINO E NELL'UOMO COME MODELLO NATURALE PER LO STUDIO DELL'INFERTILITÀ

SIMONETTA APPINO[1], PAOLA PREGEL[2], ADA ROTA[2]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari;
[2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Negli ultimi 50 anni la ricerca scientifica sulle patologie riproduttive d'interesse veterinario ha posto l'attenzione ai molti microrganismi patogeni coinvolti. Molti studi hanno evidenziato come l'infertilità rappresenti una delle più importanti cause di macellazione e di trattamento clinico nelle bovine da latte (Esslemont e Kossaibati, 1997), aspetto descritto anche da Whitaker (2000) in un'indagine che ha coinvolto 340 allevamenti. Tra i numerosi agenti infettivi ritenuti responsabili, almeno in parte, dell'infertilità bovina, spiccano *Leptospira*, virus della diarrea virale bovina, *Coxiella burnetii* e, probabilmente, *Mycobacterium paratuberculosis* (Stärk *et al*., 1997). Un ruolo importante e, allo stesso tempo, subdolo è attribuibile a *Chlamydia abortus,* causa di aborto sporadico nel bovino, e a *C. pecorum,* responsabile di metriti e infertilità, e al loro coinvolgimento nelle infezioni di varia natura nel tratto genitale della specie bovina (Bassan e Ayalon, 1971).

Questi microoganismi, che appartengono alla famiglia *Chlamydiaceae*, sono batteri gramnegativi intracellulari obbligati e possiedono un elaborato ciclo di replicazione intracellulare; sono responsabili di numerose malattie, sia negli esseri umani sia negli animali, tra le quali il tracoma, la psittacosi, l'aborto, la polmonite, la congiuntivite, l'enterite, la poliartrite, l'encefalomielite e la metrite. Le due patologie più rilevanti nell'ambito veterinario sono l'aborto enzootico nella pecora e la psittacosi negli uccelli che sono, inoltre, di grande interesse per il loro potenziale zoonotico. Negli ultimi dieci anni è stata a lungo dibattuta la suddivisione della famiglia nei due generi *Chlamydia* e *Chlamydophila,* ma né il fenotipo, irriconoscibile in base alla preferenza dell'ospite o del tropismo tissutale, né i parametri di classificazione basati sull'analisi del 16 sRNA ne hanno permesso una suddivisione certa. Attualmente, il genere *Chlamydophila* non è univocamente accettato e non viene utilizzato dalla maggioranza dei gruppi di ricerca che si occupano di questo argomento: proprio per queste ragioni riteniamo condivisibile assumere la classificazione che vede le 11 specie *Chlamydiaceae* racchiuse in un solo genere, il genere *Chlamydia* (Sachse *et al*., 2015).

Nel bovino, le infezioni da *Chlamydia* possono dare origine a diversi quadri morbosi, tra cui aborto sporadico, enteriti, polmoniti, polisierositi, encefalomieliti, infertilità e mastiti. Nell'ampio spettro di forme cliniche che coinvolgono altre specie, va ricordato l'aborto enzootico ovino che si manifesta con carattere particolarmente grave negli allevamenti di tipo intensivo. Il raggruppamento degli animali in ambienti ristretti favorisce la diffusione dell'agente infettivo. Nelle greggi indenni, l'infezione proviene dagli animali di nuova introduzione che, come spesso accade, non mostrano segni particolari di malattia fino al momento del parto. L'infezione provoca un aborto generalmente tardivo (durante le ultime 4 settimane di gestazione), o la nascita di agnelli morti o prematuri. L'infezione può inoltre determinare sia in agnelli sia in femmine non gravide infezioni latenti che diventano manifeste nella successiva stagione riproduttiva. L'identificazione degli animali infetti è estremamente importante per il controllo della diffusione della patologia.

Numerose altre specie animali sono interessate dall'infezione e tra queste il coniglio, in cui la patologia si manifesta a livello dell'apparato riproduttore, con comparsa di problemi

riproduttivi e aborto precoce, e il cavallo, dove si presenta con diverse localizzazioni e conseguenti manifestazioni cliniche quali encefalite, polmonite, aborto, artrite. Nel suino sono state evidenziate infezioni associate a una vasta gamma di segni clinici, come episodi di polmonite, pericardite, congiuntivite, artrite e aborto (Mardh *et al*., 1989).

L'agente eziologico della clamidiosi umana, *C. trachomatis*, ha un numero di ospiti limitato, infettando per via naturale quasi esclusivamente cellule epiteliali umane. Sono stati finora identificati 18 differenti sierotipi, 11 dei quali sono stati prevalentemente isolati dal tratto urogenitale. Tale microrganismo è anch'esso intracellulare obbligato ed è attualmente riconosciuto come uno dei più comuni patogeni a trasmissione sessuale.

Le infezioni genitali da *Chlamydia* costituiscono un problema per la salute pubblica mondiale in quanto il CDC (Centre of Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) stima che si verifichino ogni anno 2-3 milioni di nuovi casi, per la maggior parte asintomatici, che possono portare a complicazioni e le cui conseguenze compromettono spesso la fertilità, soprattutto nelle donne colpite. È stato stimato che tali forme asintomatiche rappresentino circa il 70-75% delle infezioni da *C. trachomatis*. I sintomi clinici dell'infezione includono scolo muco-purulento cervicale, uretrite e sanguinamenti che conducono a ectopia cervicale ipertrofica. I sintomi non diagnosticati possono essere associati ad altre infezioni come candidiasi, tricomoniasi e gonorrea. L'endometrite, presente nel 50% delle donne con cervicite muco-purulenta, può essere asintomatica o presentarsi con sanguinamento vaginale, dolore addominale basso, scolo vaginale e febbre. La frequenza con cui tali complicazioni si manifestano non è stata completamente definita, ma stime pubblicate sul rischio che le donne con infezione del tratto genitale sviluppino malattia pelvica infiammatoria (PID - pelvic infiammatory disease) oscillano dal 25 all'80%. Circa il 4% delle donne affette da PID sviluppa dolore pelvico cronico, il 3% infertilità e il 2% gravidanza difficile, anche se recentemente tali stime sono state rivalutate e sono stati calcolati rischi significativamente più bassi (Phillips *et al*. 1998). L'infezione clamidiale non trattata può persistere per mesi o anche anni e in una percentuale di donne si manifesta con salpingite clinica e subclinica, infertilità da fattore tubarico, dolore cronico pelvico, gravidanza ectopica e occasionalmente artrite e periepatite reattive.

Come indicato precedentemente, la capacità di stabilire infezione placentare e fetale è propria di molti ceppi di *Chlamydia* in diverse specie animali, indipendentemente dal tipo di placentazione.

Negli esseri umani, l'infezione da *C. trachomatis* è associata in modo significativo a patologie dell'ovidutto, come l'occlusione o le aderenze, che portano spesso alla sterilità (Shibahara *et al*., 2003). Il suo ruolo nel processo infiammatorio localizzato alle salpingi è stato confermato nelle scimmie infettate sperimentalmente (Cappuccio *et al*., 1994). Altre specie, come *C. muridarum* e *C. caviae*, hanno dimostrato di causare infezione ascendente del tratto vaginale rispettivamente di topi e cavie (Rank *et al*., 2000; Maxion *et al*., 2004). La patogenesi del danno tubarico, che costituisce la principale causa di sterilità, non è del tutto chiarita. Numerosi studi hanno proposto la necessaria presenza dell'infezione da *C. trachomatis* per la manifestazione di una salpingite cronica seguita da occlusione tubarica distale in seguito all'azione citotossica del batterio. È stato infatti ipotizzato che *Chlamydia* possieda una citotossina, un fattore di virulenza, che contribuisce alla patogenesi della malattia. Il genoma di *C. trachomatis* contiene geni che codificano per proteine con stretta omologia con le citotossine dei clostridi, ed è stato dimostrato che *C. trachomatis* presenta un'attività citotossica indipendente dalla replicazione, che induce cambiamenti morfologici in cellule epiteliali indistinguibili da quelli mediati dalla tossina clostridiale B. *C. trachomatis* infetta le cellule colonnari delle tube di Falloppio, ma non determina che un minimo danno nelle colture di tessuto tubarico, forse perché la risposta dell'ospite è più importante degli effetti tossici diretti dei prodotti batterici nella patogenesi della salpingite da *C. trachomatis* (Belland *et al*., 2001;

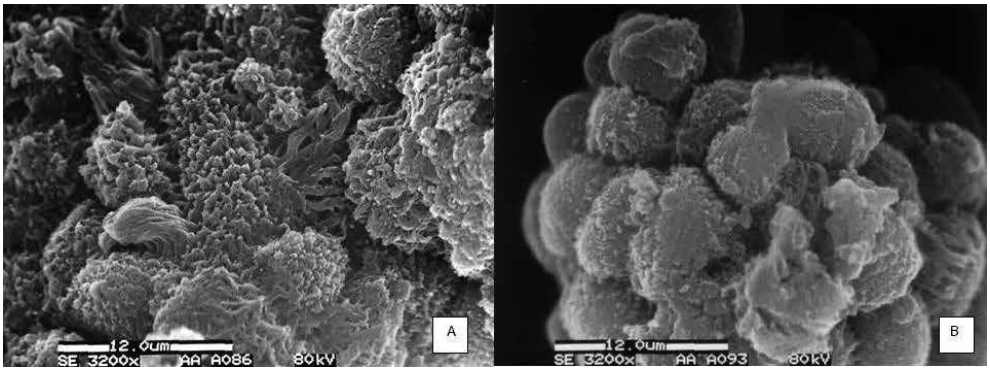


Fig. 1. Cellule di salpinge infettate con *C. abortus*. A: Controllo (SEM; 3200X). B: 48 ore dopo l'infezione: si evidenzia conglutinazione dei villi (SEM; 3200X) (Appino *et al.,* 2007).

Hafner, 2015). Nella cervicite mucopurulenta da clamidia, le biopsie cervicali evidenziano in varia misura inclusioni contenenti clamidie all'interno delle cellule colonnari; infiltrazione dell'epitelio colonnare di parte di neutrofili e della sottomucosa e dello stroma da parte di plasmacellule, linfociti, istiociti e neutrofili; aggregati linfoidi contenenti linfociti trasformati. In una serie di pazienti con cervicite muco-purulenta da clamidia, biopsie endometriali hanno evidenziato la presenza di endometrite in circa la metà dei casi: in genere questi casi si associano a dolorabilità dell'utero, sanguinamento mestruale atipico e leucocitosi, ma non a dolore addominale, febbre o a dolorabilità annessiale, a testimonianza della natura subclinica di molte delle infezioni del tratto genitale superiore sostenute da questa specie. Non si conosce la percentuale dei casi di endometrite che si associano anche a salpingite, dal momento che, in assenza di evidenti segni e sintomi di salpingite, non si esegue la laparoscopia. Tuttavia, nei casi di cervicite muco-purulenta da clamidia non associati a segni e sintomi compatibili con salpingite, è possibile dimostrare nella quasi totalità dei soggetti sottoposti a biopsia endometriale e a laparoscopia la presenza contemporanea di endometrite e di salpingite.

Malgrado siano state acquisite tutte queste conoscenze sull'argomento (Phillips *et al.,* 1998), non è ancora nota una singola specie animale che possa essere considerata come modello umano unico per l'infezione da *Chlamydia*. Ogni modello utilizzato rispecchia aspetti differenti dell'infezione nell'uomo. Sono stati impiegati topi, cavie, primati e suino, e tutte queste specie mostravano aspetti differenti: la cavia e il suino sono sembrati i più adatti allo studio della patogenesi e della trasmissione sessuale. Riteniamo che una valida alternativa ai modelli attualmente studiati possa essere rappresentata dallo studio dell'infezione spontanea da *C. abortus* nel bovino, principalmente per le similitudini evidenziabili nella patogenesi di tale infezione.

C. abortus è in grado di infettare la specie bovina causando aborti, sporadico e tardivo, analogamente a quanto avviene nelle donne che durante la gravidanza si espongono alla presenza del microrganismo. Come precedentemente ricordato, *Chlamydia* è un microrganismo non strettamente ospite-specifico e capace di determinare patologie che colpiscono diversi tessuti. L'infezione di cellule della salpinge bovina in primo espianto sia in monostrato sia sottoforma di vescicole ha permesso di dimostrare come tale microrganismo sia in grado di infettare l'epitelio delle salpingi e determinare modificazioni nelle cellule, tali da indurre un danno permanente che porta verosimilmente all'infertilità (Appino *et al*., 2007). Per questo scopo le

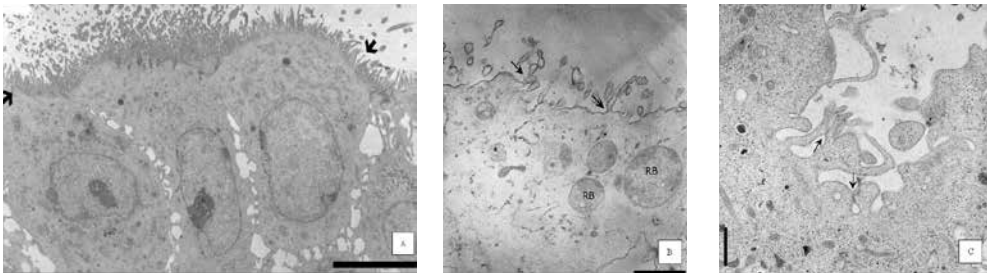


Fig. 2. Vescicole di cellule dell'ovidutto bovino. A: controllo non infetto (TEM; barra: 5 μm). B: 48 ore dopo l'infezione: marcata atrofia dei microvilli (frecce) (TEM; barra: 1 μm). C: 48 ore dopo l'infezione: dettaglio della superficie con fusione apicale dei microvilli (frecce) (TEM; barra: 1 μm).

cellule sono state infettate con un ceppo di *C. abortus*, poi fissate per sottoporle a successive colorazioni. La fissazione è stata effettuata in considerazione dei tempi determinati dal particolare ciclo di replicazione del microrganismo (fase replicativa e di avvenuta infezione), attendendo cioè che l'intero ciclo replicativo fosse concluso. Il ciclo replicativo è di circa 48-72 ore, in relazione alla specie di *Chlamydia,* con l'alternanza di due entità del microrganismo: corpo elementare, che costituisce l'unità infettante, e corpo reticolare non infettivo, che rappresenta la forma replicativa. La valutazione diretta d'infezione è stata effettuata per mezzo di opportune colorazioni May Grünwald-Giemsa e immunocitochimica per LPS di clamidia (Bollo *et al*., 1992), che ha rivelato corpi inclusi e vacuolizzazione. Una più accurata analisi ultrastrutturale, attraverso SEM e TEM, ha infine evidenziato che le cellule infette mostravano diversi gradi di danno cellulare e conglutinazione dei microvilli dell'epitelio tubarico (fig. 1). Sulla superficie di tali cellule erano presenti vescicole infettanti di *Chlamydia* sotto forma di particelle arrotondate, probabilmente corpi elementari (fig. 2), mentre una marcata atrofia e conglutinazione dei microvilli conferivano un aspetto liscio alla superficie dell'epitelio. Tali alterazioni andavano a modificare le normali funzioni delle cellule epiteliali tubariche. Ogni cellula ciliata, infatti, presenta a livello della superficie endoluminale ben 250-300 cilia dotate di un moto pendolare sincrono (il battito ciliare) con una frequenza di 20 battiti al secondo. Il movimento ciliare è pro-uterino, generando un flusso in direzione uterina finalizzato a trasportare prima l'ovocita nel terzo distale tubarico dove avviene la fecondazione e poi lo zigote dal terzo distale alla cavità uterina. La riduzione di tali strutture, unitamente al danno citoplasmatico dell'epitelio, influenza l'esito della fecondazione.

C. abortus, analogamente a quanto descritto per topi infettati con *C. trachomatis* (Phillips e Burillo, 1998), potrebbe portare alla sterilità delle bovine. Questa ipotesi è stata altresì supportata dal rinvenimento di *C. abortus* in salpingi di bovini destinati alla macellazione per motivi d'infertilità (Appino *et al*., 2015). I danni cronici dovuti alla persistenza dell'infezione da *Chlamydia* o a ripetute infezioni appaiono sovrapponibili alle lesioni rinvenute nell'infezione cronica a opera di *C. trachomatis* nella donna (Askienazy-Elbhar *et al*., 1999) e simili, negli aspetti istolesivi, alle lesioni oculari che si rinvengono nel tracoma (Derrick *et al*., 2015).

Bibliografia

- Askienazy-Elbhar M, Suchet JH 1999. Persistent "silent" *Chlamydia trachomatis* female genital tract infections. Infect Dis Obstet Gynecol 7:31-34.
- Appino S, Pregel P, Manuali E et al. 2007. Infection of bovine cell cultures with *Chlamydophila abortus*. Anim Reprod Sci 98:350-356.
- Appino S, Vincenti L, Rota A et al. 2015. *Chlamydia abortus* in cows oviducts, occasional event or causal connection? Reprod Dom An 50:526-528.
- Bassan Y, Ayalon N 1971. Abortion in dairy cows inoculated with epizootic bovine abortion agent *(Chlamydia)*. Am J Vet Res 32:703-710.
- Belland RJ, Scidmore MA, Crane DD et al. 2001. *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. Proc Natl Acad Sci USA, 98:13984-9.
- Bollo E, Biolatti B, Donn A, T 1992 Preparation and use of a monoclonal antibody to detect Chlamydia psittaci antigen in paraffin-embedded tissue sections.Res Vet Sci. 1992 Nov;53(3):393-6.
- Cappuccio AL, Patton DL, Kuo CC et al. 1994. Detection of Chlamydia trachomatis deoxyribonucleic acid in monkey models (*Macaca nemestrina*) of salpingitis by in situ hybridization: implications for pathogenesis. Am J Obstet Gynecol 171:102-110.
- Esslemont RJ, Kossaibati MA 1997. Culling in 50 dairy herds in England. Vet Rec 140:36-39.
- Hafner LM 2015.Pathogenesis of fallopian tube damage caused by *Chlamydia trachomatis* infections. Contraception. 92:108-115.
- MardhP.A., Paavonen J., Puolakkainen M 1989. Chlamydia, Springer IBSN 0-306-42965-9.
- Maxion HK, Liu W, Chang MH et al. 2004. The infecting dose of *Chlamydia muridarum* modulates the innate immune response and ascending infection. Infect Immun 72:6330-6340.
- Phillips DM, Burillo CA 1998. Ultrastructure of the murine cervix following infection with *Chlamydia trachomatis*. Tissue Cell 30:446-52.
- Rank RG, Bowlin AK, Kelly KA 2000. Characterization of lymphocyte response in the female genital tract during ascending Chlamydial genital infection in the guinea pig model. Infect Immun 68:5293-5298.
- Belland RJ, Scidmore MA, Crane DD et al. *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 November 20; 98:24.
- Shibahara H, Takamizawa S, Hirano Y et al. 2003. Relationships between *Chlamydia trachomatis* antibody titers and tubal pathology assessed using transvaginal hydrolaparoscopy in infertile women. Am J Reprod Immunol 50:7-12.
- Stärk KD, Frei-Stäheli C, Frei PP et al. 1997. Frequency and cost of health problems in Swiss dairy cows and their calves (1993-1994). Schweiz Arch Tierheilkd 139:343-353.
- Derrick T, Roberts CH, Last AR et al. 2015. Trachoma and Ocular Chlamydial Infection in the Era of Genomics. Mediators of Inflammation. LSHTM Research Online 791847.
- Whitaker DA, Kelly JM, Smith S 2000. Disposal and disease rates in 340 British dairy herds. Vet Rec 146: 363-367.
- Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B et al. 2015. Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. Syst Appl Microbiol 38:99-103.

L'OPOSSUM IN CATTIVITÀ, MODELLO SPONTANEO PER LO STUDIO DELL'ENDOCARDITE BATTERICA NELL'UOMO

FRANCO GUARDA

Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

L'endocardite batterica è un processo infiammatorio delle valvole e dell'endocardio murale cardiaco che può colpire spontaneamente sia l'uomo sia gli animali, mammiferi, uccelli e pesci.

Già Fox (1924) dimostrò che nell'opossum l'endocardite batterica era molto frequente nel corso di infezioni da germi, soprattutto in quelle sostenute da *Streptococcus viridans*, confermate più tardi da la Plaute (1966) e da Sherwood *et al*. (1968).

Alcuni animali sono più frequentemente colpiti, come il bovino e il cane (figg. 1, 2), meno il suino e il cavallo (Marcato, 2015) anche se le loro incidenza è più bassa rispetto all'uomo (Kayed, 1976) per diversi motivi: per un certo tempo la lesione cardiaca rimane silente, non sempre vengono effettuati gli esami di laboratorio per la conferma e di rado dopo la morte vengono sottoposti a un attento esame necroscopico.

Tuttavia è universalmente accettato che l'animale più sensibile all'endocardite batterica è l'opossum allevato in cattività.

L'opossum (*Didelphis virginiana*), della famiglia Didelfidi, marsupiale originario del Sud-America, viene catturato e allevato per la pelliccia di ottima qualità e ricercata in tutto il mondo (Scortecci, 1953).

A ulteriore conferma della altissima frequenza dell'endocardite vegetante o ulcero-poliposa nelle infezioni batteriche nell'opossum in cattività, Rowlands *et al*. (1970) riprodussero sperimentalmente in questo animale sano la suddetta lesione con un'unica inoculazione endovenosa di *Streptococcus viridans,* mentre in tutti gli altri animali sono necessarie più inoculazioni nel corso dell'esperimento per riprodurre la stessa patologia.

Tuttavia rimangono sconosciuti gli specifici fattori che aumentano la suscettibilità nell'opossum all'endocardite (Sherwood *et al*., 1971).

In realtà, anche i lattonzoli in certi casi possono essere colpiti in modo massivo da endocardite batterica quando sono infettati sperimentalmente con il germe del malrossino in circa il 60% dei casi dopo una singola inoculazione (Coolubs *et al*., 1926) (fig. 3).

Nei pesci, al contrario, l'endocardite batterica è poco conosciuta e trascurata poiché nei pesci alibili non viene eseguita la necroscopia, mentre in quelli colpiti da infezioni batteriche non viene di regola osservato il cuore, anche se questo è considerato un organo bersaglio nel corso di alcune malattie batteriche (Ferguson, 1989; Bruno e Poppe, 1996).

In genere negli animali l'endocardite ulcero-poliposa è presente nel corso di malattie batteriche croniche setticemiche con focolai localizzati in altri settori extracardiali.

L'endocardite colpisce prevalentemente la valvola mitrale a eccezione del bovino e degli uccelli. Nel primo caso la frequenza della sindrome da corpo estraneo con relativi focolai purulenti al fegato e ad altri organi facilita il passaggio dei germi nella vena cava caudale con immissione di germi nell'atrio destro (fig. 4).

Nel pollo, come d'altronde negli uccelli, la valvola cardiaca destra è di natura muscolare e quindi vi è maggiore possibilità attraverso i capillari della valvola che i batteri si localizzino in tale valvola (fig. 5).

Fig. 1. Cane, cuore: endocardite ulcero-poliposa a carico delle valvole aortiche.

Fig. 3. Suino lattonzolo di 2 mesi: endocardite ulcero-poliposa da mal rossino.

Fig. 4. Bovino, cuore: endocardite ulcero-poliposa a carico di ampie porzioni dell'atrio destro.

Fig. 2. Cane, cuore: endocardite ulcero-poliposa con perforazione del tessuto valvolare della mitrale.

Fig. 5. Pollo, cuore: endocardite ulcero-poliposa a carico della valvola destra.

Macroscopicamente l'endocardite ulcero-poliposa si presenta come una vegetazione a cavolfiore sulla valvola, di colore rosso-giallastro o giallo-grigiastro, friabile, che può esser rimossa facilmente e con una superficie rugosa.

Istologicamente le vegetazioni sono costituite da accumuli di fibrina per lo più stratificata con numerose colonie batteriche infiltrate da un gran numero di granulociti neutrofili generalmente accompagnati da focolai di necrosi e emorragie.

Per lo più alla base della lesione si osserva una iniziale organizzazione connettivale con distruzione della normale struttura valvolare. Frequenti possono essere gli emboli. Le vegetazioni sono di solito lungo la linea di chiusura delle valvole ma possono coinvolgere tutta la parete valvolare.

D'altro canto anche vizi valvolari, come stenosi sub-aortiche o sub-polmonari associati a setticemia, rappresentano *loci minoris resistentiae* per l'instaurarsi di endocardite come avviene nell'uomo, nel cane, nel suino (Fontana e Edwards, 1962; Morrow *et al*., 1965; Roberts *et al*., 1973; Muna, 1978; Guarda *et al*., 1995). Infatti tutte le lesioni cardiache che alterano il flusso ematico e la formazione di vortici favoriscono l'insorgenza delle endocarditi batteriche, anche per l'eventuale presenza di anticorpi che determinano agglutinazione dei batteri con il trombo fibrinoso.

Per il suino è stato dimostrato in vitro che alcuni ceppi di *Erysipelothrix rhusiopatiae* possono aderire selettivamente all'endotelio valvolare (Brutheng, 1981).

Le complicazioni batteriche delle endocarditi sono generalmente gravi per la formazioni emboliche che possono coinvolgere altri organi come il cuore (con infarti miocardici), il polmone e i reni.

Nell'uomo l'endocardite batterica è sovrapponibile a quella degli animali, particolarmente nel bovino, nel cane e nell'opossum, cioè la cosiddetta endocardite ulcerosa subacuta con stratificazioni poliposo-vegetanti molto estese. Al contrario dell'endocardite ulcerosa acuta, i processi produttivi sono più evidenti con formazione di tessuto di granulazione accompagnato da masse trombotiche e ampie distruzioni del tessuto valvolare.

Generalmente questa forma subacuta è provocata da *Streptococcus viridans*, mentre nella forma acuta è provocata in circa il 70-80% dei casi da *Streptococcus* spp. e da stafilococchi.

Sempre nell'uomo, l'endocardite infettiva si localizza generalmente su valvole già lese precedentemente come nelle valvulopatie reumatiche, o con lesioni di alterato deflusso ematico con decorso acuto e con germi virulenti quali *Streptococcus viridans*. Al contrario, se i germi si insediano su valvole normali il decorso è normalmente subacuto e i germi sono meno patogeni come *Streptococcus viridans* (Thiene, 1988).

In ogni caso l'endocardite batterica degli animali è simile in tutti i casi a quella subacuta dell'uomo.

Pertanto l'endocardite batterica costituisce un problema su cui ancora oggi si discute non essendo ancora completamente chiarite la patogenesi e l'istogenesi dalla prima segnalazione nell'uomo di "endocardite" da parte di Breulland nel 1835 (Doerr, 1974).

Certamente la patogenesi di questa lesione è complicata, e frequentemente non è compresa in modo completo (Van Vleet e Ferrans, 2007) ma è sempre presente la triade di Virchow, cioè la lesione dell'endotelio, la turbolenza e l'ipercoagulità ematica. In altre parole deve esistere una batteriemia, un locus intravascolare vulnerabile e un meccanismo di impianto per i batteri.

Rimangono tuttavia ancora interrogativi senza risposta.

Infatti tutti i germi sono in grado di produrre un'endocardite batterica, ma nell'uomo streptococchi e stafilococchi provocano la maggioranza dei casi di endocardite, in circa il 90-95% dei soggetti colpiti.

Negli animali per esempio prevale *Trueperella pyogenes* e lo streptococco nel bovino, lo streptococco suino ed *Erysipelothrix rhusiopatiae* nel suino, lo stafilococco aureo ed *Escherichia coli* nel cane (Marcato, 2015).

Soltanto nel suino è stata dimostrata una reazione immunitaria alla base dell'endocardite nella fase cronica della malattia.

Due sono le possibilità nel meccanismo di infezione, cioè: la valvola è infettata dall'embolizzazione nel microrganismo nell'interstizio valvolare sulla superficie, oppure la valvola è infettata sulla superficie endoteliale con lo sviluppo di trombi sulla superficie già danneggiata. Questa seconda ipotesi sembra la più valida (Anguist e Oka, 1963) e confermata sperimentalmente nel coniglio (Durack e Beeson, 1972).

Come fattori predominanti sono in prima linea le forze idrodinamiche del sangue (Rowlands, 1963).

L'endocardite si verifica preferibilmente quando la corrente sanguigna passa attraverso un orifizio da una camera ad alta pressione a un'altra a bassa pressione, come avviene in certe circostanze tra il VS e il VD o dal VS alla aorta, come dimostrato nell'uomo, cane e suino.

Per il suino è stato dimostrato in vitro che alcuni ceppi di *E. rhusiopataie* possono aderire selettivamente all'endotelio valvolare (Brutherg, 1981).

Le complicazioni batteriche delle endocarditi sono generalmente gravi a causa delle formazioni emboliche che possono coinvolgere altri organi come il cuore con infarti miocardici, o il polmone o i reni.

I microorganismi devono entrare nella corrente circolatoria a intervalli di tempo per provocare l'endocardite, attraverso la via linfoematica, direttamente nella corrente sanguigna con trombi infetti o durante una malattia batterica per inoculazione iatrogena di sostanze infette.

Sperimentalmente è anche stato dimostrato che vegetazioni batteriche inoculate con alcuni patogeni tendono a guarire spontaneamente (Perlman e Freedman, 1971).

In effetti, il meccanismo con il quale il processo infiammatorio inizia sulle valvole non è ancora del tutto chiaro. Sembra infatti che l'endotelio valvolare sia molto sensibile a microtraumi con conseguente edema siero-plasmatico e distruzione cellulare endoteliale, quindi aderenza di piastrine e fibrina e successivamente formazione di un trombo a cui farebbe seguito il processo infiammatorio.

Sembra inoltre che la primitiva lesione endoteliale sia di origine allergica con adesione di batteri.

Non sono da sottovalutare poi le differenti forme di stress, con o senza componenti antigeniche, le quali provocano iniziali alterazioni dell'endotelio e degli spazi interstiziali.

Sperimentalmente sono state indotte endocarditi dopo esposizione a vari stressors sistemici.

Infine le lesioni infiammatorie batteriche dell'endocardio possono essere differenziate da quelle da altre eziologie, da sindromi tossiche, da malattie virali da quelle di origine immunitaria, come avviene nel reumatismo dell'uomo.

Le endocarditi abatteriche dell'uomo per ora non sono state diagnosticate negli animali (Marcato, 2015).

La bibliografia è a disposizione, su richiesta all'autore.

IL SUINO COME MODELLO DI STUDIO DELLA TUBERCOLOSI OSSEA NELL'UOMO (MORBO DI POTT)

BENEDETTA AMATO[1], MARIA VITALE[1], MARIA TERESA CAPUCCHIO[2], MICHELE FIASCONARO[1], ROBERTO PULEIO[1], VINCENZO DI MARCO LO PRESTI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri,
[2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Introduzione

La tubercolosi è, ancora oggi, la seconda malattia infettiva dopo la malaria e continua a rimanere la causa principale di lesioni ossee in campo umano. I Paesi più colpiti sono quelli in via di sviluppo in quanto sussistono maggiormente le condizioni predisponenti allo sviluppo di tale malattia (soprattutto nella sua manifestazione ossea e articolare), tra le quali si annoverano la malnutrizione, la presenza di malattie che inducono immunodepressione quale ad esempio l'HIV e le scarse condizioni ambientali, igieniche e sanitarie. Generalmente tale forma di tubercolosi può costituire fino al 35% delle forme extra-polmonari e il 2% circa di quelle totali (Mohideen e Rasool, 2013). Colpisce con maggior frequenza i giovani adulti e appaiono maggiormente predisposti gli individui di colore e le donne, soprattutto se soggette a parti frequenti o durante il periodo della lattazione (Lateef Mousa, 2007). L'agente eziologico isolato con maggior frequenza è *Mycobacterium tuberculosis* tuttavia sono riportati casi di infezioni da *M. bovis* e MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis) (Lateef Mousa, 2007; Pigrau-Serrallach e Rodriguez-Pardo, 2013). Dal punto di vista patogenetico la diffusione dei bacilli tubercolari in sede osteoarticolare è prevalentemente ematogena a partire da focolai di origine polmonare; viceversa i MOTT penetrano in genere in seguito a eventi traumatici o chirurgici mentre le infezioni vertebrali da *M. bovis* sono dovute alla risalita del patogeno dalla vescica attraverso il plesso venoso di Batson (plesso venoso epidurale) (Pigrau-Serrallach e Rodriguez-Pardo, 2013). Lo spiccato tropismo del micobatterio per tali tessuti è strettamente correlato all'elevato grado di vascolarizzazione di quest'ultimi. Si tratta di una vera e propria "carie" che colpisce prevalentemente vertebre e ossa lunghe. Nella colonna vertebrale l'evoluzione presuppone il collasso di una o più vertebre con conseguente deformazione del rachide e/o il coinvolgimento del canale midollare e, di conseguenza, delle meningi (meningite) con clinicamente forme più o meno estese di paresi, paralisi e, nei casi più gravi, paraplegia (Aydın *et al*., 2016). Nelle ossa lunghe è l'epifisi e, in particolare, la fisi (cartilagine d'accrescimento) a essere interessata in fase preliminare, quindi l'infezione si diffonde progressivamente alla cavità articolare con coinvolgimento della capsula che va incontro a processi flogistici con conseguente formazione di tessuto di granulazione e progressiva erosione della cartilagine sottostante. La presenza di un'osteomielite con distruzione del tessuto osseo, minima rigenerazione e mancanza di sequestri è altamente indicativa di una spondilite articolare in fase attiva (Kahn e Pritzker, 1973).

Il morbo di Pott è un'evoluzione della patologia tubercolare scarsamente documentata in letteratura veterinaria. Quadri di spondilite tubercolare sono stati descritti in una poiana della Giamaica (*Buteo jamaicensis*) (Sadar *et al*., 2015), nei canguri (Kennedy *et al*., 1978), nei macachi *Rhesus* (Martin *et al*., 1968; Fox *et al*., 1974), nei leoni (Kirberger *et al*., 2006) per quanto riguarda gli animali selvatici, nel cavallo (Perdue *et al*., 1991; Hewes *et al*., 2005), nel bovino, nella capra, e negli avicoli (Guarda *et al*., 2013) per quanto riguarda gli animali domestici. La specie suina è suscettibile al *Mycobacterium* complex sia nella sua variante

selvatica (cinghiale) (Martin Hernando *et al*., 2007) sia in quella domestica nelle differenti tipologie di allevamento (semi-intensivo, semibrado, brado) (Di Marco *et al*., 2012; Bailey *et al*., 2013). I reperti anatomo-patologici descrivono sia forme localizzate, prevalentemente ai linfonodi della regione della testa, sia quadri generalizzati. Le segnalazioni bibliografiche che riportano forme di tubercolosi ossea in questa specie risalgono agli anni '30 del secolo scorso (Ottonsen, 1931) e più recentemente nel libro sulla tubercolosi animale redatto da Guarda *et al*. (2013).

Esame clinico e anatomo-patologico

Negli esseri umani sebbene potenzialmente l'infezione possa colpire indistintamente qualsiasi osso dello scheletro assile e appendicolare, la localizzazione più frequente è la colonna vertebrale, mentre nel 90% dei casi l'artrite interessa unicamente un'articolazione (anca, ginocchio, spalla, gomito le più colpite) (Lateef Mousa, 2007). Dal punto di vista clinico si manifesta con dolore localizzato, progressiva deformazione del rachide (cifosi), paresi, paralisi fino alla paraplegia, accompagnati da sintomi aspecifici e sistemici quali debolezza, febbre, perdita di peso. Qualora sia interessata l'articolazione, questa si presenta gonfia, dolente al tatto con conseguente limitazione dei movimenti legata anche alla presenza di ascessi freddi che si infiltrano nei fasci muscolari circostanti.

Negli animali le manifestazioni cliniche di soggetti affetti da tubercolosi ossea sono molto più difficili da documentare, per cui si tratta perlopiù di riscontri anatomo-patologici ottenuti in sede necroscopica o durante l'attività ispettiva al macello. Nel corso del 2013 è stato possibile individuare un caso di morbo di Pott in un gruppo di suini ibridi commerciali allevati per uso familiare all'interno di un comune del Parco dei Nebrodi in provincia di Messina (Sicilia). Si trattava di un totale di 7 soggetti di età compresa tra i 12 e i 24 mesi allevati in promiscuità con ovini, caprini e bovini e alimentati con siero di latte bovino e scarti alimentari domestici e vegetali. L'azienda risultava ufficialmente indenne da tubercolosi, brucellosi e leucosi, tuttavia un paio di anni prima era stato segnalato un focolaio di tubercolosi nei bovini. All'esame obiettivo generale gli animali si presentavano in buono stato di salute e nutrizione, eccezion fatta per una scrofa che mostrava una forma di claudicazione di grado moderato all'arto posteriore sinistro. In seguito all'esecuzione dell'intradermoreazione (IDT) i soggetti, risultati tutti positivi, venivano macellati. All'esame anatomo-patologico si osservavano gravi forme di generalizzazione precoce protratta che interessavano i linfonodi di tutti i distretti e organi, quali pleura, polmoni, fegato, milza, omento, e, in un caso, anche i reni. In due soggetti risultavano coinvolte anche le ghiandole mammarie con lesioni necrotiche tendenti alla confluenza e alla colliquazione che lasciavano defluire al taglio il materiale presente all'interno dei dotti papillari del capezzolo, quadro anatomo-patologico, quest'ultimo, ascrivibile al periodo post-primario dell'infezione (fenomeno piuttosto raro nella specie suina). Le carcasse presentavano evidenti lesioni nodulari a livello costale di forma ovale e/o allungata, piatte, della grandezza variabile da una noce a un'arancia, isolate o confluenti, lisce o rugose e di consistenza dura al tatto (fig. 1). Al taglio era evidente il grado di deformazione ossea associato alla progressiva sostituzione del tessuto mineralizzato con materiale caseoso. La colonna vertebrale mostrava erosioni più o meno estese a carico dei corpi vertebrali e dei processi spinosi soprattutto della regione toracica, lombare e sacro-coccigea, associate a necrosi di colore giallastro e consistenza compatta che occasionalmente conferiva all'osso un aspetto cribroso (fig. 2). Il tessuto che delimitava le aree necrotiche colpite si presentava di colore e consistenza madreperlacea e compatta facendo presupporre un'origine fibro-connettivale con funzione riparativa/sostitutiva (fig. 3). Di difficile valutazione i processi trasversi, a causa del taglio in mezzene. In più di un'occasione il materiale caseoso protrudeva nel canale

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

midollare andando a comprimere il midollo spinale (fig. 4). In aggiunta su pareti e pavimento del canale erano evidenti fenomeni infiammatori granulomatosi che interessavano anche le meningi, affette da una forma di meningite (fig. 5). Non si rilevavano invece alterazioni macroscopiche a carico del midollo (sebbene sia molto raro repertare lesioni macroscopiche a carico dei fasci nervosi periferici e del midollo spinale), né segni di anchilosi o fenomeni degenerativi a carico dei dischi intervertebrali, pertanto la componente articolare della colonna vertebrale appariva preservata e integra nelle sue funzioni.

Caso a parte quello di una scrofa di Suino nero dei Nebrodi di età superiore ai 24 mesi (razza autoctona siciliana inserita nell'elenco delle razze R.A.R.E.) ispezionata al macello, che presentava lesioni diffuse agli organi delle cavità splancniche nonché lesioni a carico delle mammelle e dell'articolazione coxo-femorale con coinvolgimento della capsula articolare, che all'esame macroscopico si presentava ispessita, di aspetto lardaceo e infiltrata di materiale necrotico colliquato di colore giallo-verdastro (fig. 6). Aree litiche ed erosive erano inoltre presenti a livello della testa del femore.

Referti radiologici

In campo umano gli ausili della diagnostica per immagini più accreditati, qualora si sospetti una forma di tubercolosi ossea, sono l'esame radiografico per quanto riguarda le ossa lunghe e la risonanza magnetica per il rachide, poiché con quest'ultima si riesce a distinguere tra tessuto di granulazione, ascessi ed eventuali masse neoplastiche. Inoltre è possibile fare una valutazione del grado di distruzione del tessuto osseo. Infine, se si volessero valutare eventuali anomalie nella calcificazione o la presenza di sequestri, risulta ottimale l'uso della tomografia assiale computerizzata (TAC) (Lateef Mousa, 2007). Il reperto più frequente nelle forme articolari (soprattutto l'articolazione dell'anca) è una forma di osteopenia localizzata. Seguono le lesioni cistiche, che possono presentarsi rotonde o ovali e, con una frequenza ridotta, fratture, sequestri, coinvolgimento della fisi, lesioni infiltrative e/o erosive, e interessamento delle articolazioni digitali. Le forme osteoarticolari presentano un'incidenza maggiore rispetto a quelle extra-articolari.

Le carcasse dei suini esaminati venivano sottoposte a esame radiografico. I referti rilevavano la presenza di aree di ridotta densità ossea e osteolisi "a carta geografica" con margini netti a livello costale e formazioni cistiche radiotrasparenti in corrispondenza delle lesioni macroscopiche vertebrali (fig. 7). Sono state inoltre identificate aree di rarefazione ossea a carico dell'epifisi delle ossa lunghe degli arti, soprattutto posteriori, e della testa del femore. Nel Suino nero che presentava il coinvolgimento della capsula articolare, all'esame radiografico si evidenziava una voluminosa area di radio opacità variabile e dai contorni indistinti in corrispondenza dell'articolazione interessata e dei fenomeni necrotici (fig. 8).

Esami istologico e immunoistochimico

Gli esami istologico e immunoistochimico, scarsamente utilizzati in campo umano a scopo diagnostico per tale tipologia di lesioni, trovano ampio riscontro in campo veterinario come esami ausiliari in presenza di *tuberculosis-like* lesions.

Esame istologico

Istologicamente, lesioni granulomatose sono state osservate in costole e vertebre. In particolare, il tubercolo (tipico granuloma) conteneva un nucleo centrale di tessuto necrotico, a volte caratterizzato da fenomeni di calcificazione distrofica, circondato da cellule epitelioidi e più perifericamente da macrofagi e linfociti con vari gradi di fibroplasia e fenomeni di

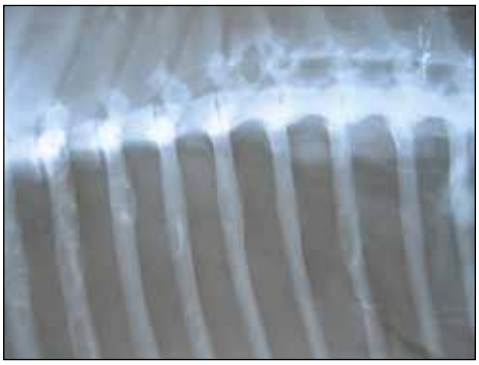


Fig. 7

Fig. 8

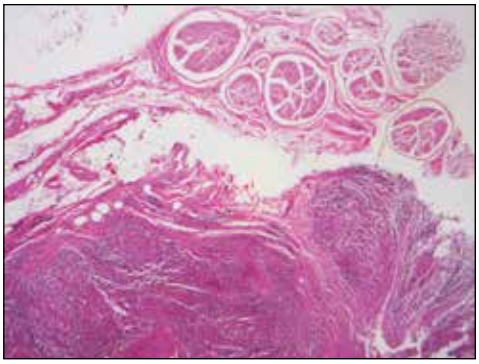


Fig. 9

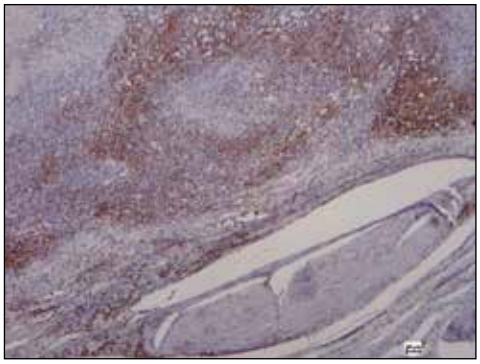


Fig. 10

riassorbimento osseo; l'incapsulamento dei granulomi risultava spesso incompleto (fig. 9).

Il riassorbimento osseo attivo e la moderata osteogenesi sono altamente indicativi di un processo infiammatorio cronico.

Immunoistochimica (IHC)

E' stata eseguita una caratterizzazione immunoistochimica dei granulomi riscontrati in sede ossea. La presenza di linfociti marcati con l'anticorpo per il recettore CD3 si è rivelata preponderante a livello del vallo periferico della lesione in prossimità delle aree più ricche di cellule macrofagiche (fig.10). Sono state inoltre identificate le cellule epitelioidi, che mostravano un'alta espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di tipo II. I linfociti B (marcati con il CD79) e le cellule giganti costituivano viceversa popolazioni minoritarie nella composizione del granuloma. Abbondante la presenza di bacilli tubercolari sia in forma libera sia all'interno dei macrofagi in maggiore quantità nelle aree periferiche piuttosto che in quelle centrali del tubercolo.

Conclusioni

L'utilizzo di modelli animali per lo studio dell'infezione tubercolare trova ampio riscontro in letteratura (Van Leeuwen *et al*., 2014; Ordonez *et al*., 2016; Rahyussalim *et al*., 2016). Il

suino presenta delle similitudini genetiche, anatomiche e fisiologiche con l'essere umano e ciò lo rende di gran lunga più idoneo a essere utilizzato come modello per studi comparati rispetto al modello murino (Schook *et al*., 2015). In particolare il sistema immunitario di questa specie, sia nella sua componente innata sia in quella adattativa, è sovrapponibile in gran parte a quello umano, tale da renderla un'ottima candidata per lo studio di malattie infettive come la tubercolosi (Meurens *et al*., 2012). Infatti quanto osservato dagli autori in corso di osteomielite tubercolare nei suini evidenzia notevoli analogie con quanto descritto nella specie umana a partire da età (colpiti soggetti giovani), localizzazione delle lesioni (più interessata la colonna vertebrale dello scheletro appendicolare, e tra le articolazioni risulta maggiormente coinvolta quella coxofemorale con lesioni perlopiù osteoarticolari che extra-articolari) e infine tipologia di lesione riscontrata (forme erosive osteopeniche con formazione di cisti ossee).

Ulteriori studi sono necessari al fine di chiarire sia l'esatta dinamica patogenetica dell'infezione tubercolare che determina lo sviluppo della forma ossea (posto che la fonte primaria di infezione nella specie suina sia quella alimentare e gli animali analizzati vengano tenuti in strutture separate dai bovini infetti), sia la composizione del granuloma, le popolazioni cellulari implicate nella risposta immunitaria e la loro successiva attivazione e interazione, a oggi non del tutto caratterizzate in questa malattia e in questa specie.

Bibliografia

- Aydın T, Taşpınar Ö, Keskin Y, Kepekçi M, Güneşer M, Çamlı A, Seyithanoğlu H, Kızıltan H, Eriş AH, 2016. A Rare Complication of Tuberculosis: Acute Paraplegia. *Ethiop J Health Sci*;26: 405-7.
- Bailey SS, Crawshaw TR, Smith NH, Palgrave CJ, 2013. Mycobacterium bovis infection in domestic pigs in Great Britain.*Vet J*;198: 391-7.
- Di Marco V, Mazzone P, Capucchio MT, Boniotti MB, Aronica V, Russo M, Fiasconaro M, Cifani N, Corneli S, Biasibetti E, Biagetti M, Pacciarini ML, Cagiola M, Pasquali P, Marianelli C, 2012. Epidemiological Significance of the Domestic Black Pig (Sus scrofa) in Maintenance of Bovine Tuberculosis in Sicily. *J. Clin. Micr*; 50:1209-1218.
- Fox JG, Campbell LH, Snyder SB, Reed C, Soave OA, 1974. Tuberculous spondylitis and Pott's paraplegia in a rhesus monkey (Macaca mulatta). *Lab Anim Sci*; 24:335-9.
- Guarda F, Bollo E et al, 2013. La tubercolosi negli animali. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia- Romagna, Università di Torino; EditPress.
- Kahn DS, Pritzker KPH, 1973. The pathophysiology of bone infection. *Clin Orthop*; 96:12-9.
- Kennedy S, Montali RJ, James AE Jr, Bush M, 1978. Bone lesions in three tree kangaroos. *J Am Vet Med Assoc*; 9:1094-8.
- Hewes CA, Schneider RK, Baszler TV, Oaks JL, 2005. Septic arthritis and granulomatous synovitis caused by infection with Mycobacterium avium complex in a horse. *J Am Vet Med Assoc*;226: 2035-8, 2002.
- Kirberger RM, Keet DF, Wagner WM, 2006. Radiologic abnormalities of the appendicular skeleton of the lion (Panthera leo): incidental findings and Mycobacterium bovis-induced changes. *Vet Radiol Ultrasound*; 47:145-52.
- Lateef Mousa HA, 2007. Bones and Joints Tuberculosis. *Bahrain Medical Bulletin*; Vol. 29, N1, 1-9.
- Martin JE, Cole WC, Whitney RA Jr, 1968. Tuberculosis of the spine (Pott's disease) in a rhesus monkey (Macaca mulatta). *J Am Vet Med Assoc*; 153:914-7.
- Martìn-Hernando MP, Höfle U, Vicente J, Ruiz-Fons F, Vidal D, Barral M, Garrido JM, de la Fuente J, Gortazar C, 2007. Lesions associated with Mycobacterium tuberculosis complex infection in the European wild boar. *Tuberc*; 87, 360-367.
- Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdts V, 2012.The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology*; Vol. 20, N1, 51-7.
- Mohideen MAF & Rasool MN, 2013. Tuberculosis of the hip joint region in children. *Orthopaedic Journal Autumn*; Vol 12, N 1, 38-43.
- Ordonez AA, Tasneen R, Pokkali S, Xu Z, Converse PJ, Klunk MH, Mollura DJ, Nuermberger EL, Jain SK, 2016. Mouse model of pulmonary cavitary tuberculosis and expression of matrix metalloproteinase-9. *Dis Model Mech*;9:779-88.
- Ottonsen H, 1931. Histological studies on tuberculosis of bones in swine. *Skand VetTidskr*; 32:210-260.
- Perdue BD, Collier MA, Dzata GK, Mosier DA, 1991. Multisystemic granulomatous inflammation in a horse. *J Am Vet Med Assoc*;198:663-4.
- Pigrau-Serrallach C & Rodrı´guez-Pardo D, 2013. Bone and joint tuberculosis. *Eur Spine J*; 22: S556–S566.

– Rahyussalim AJ, Kurniawati T, Siregar NC, Syahrurachman A, Dilogo IH, Iskandriati D, Fitri AD, 2016. New Bone Formation in Tuberculous-Infected Vertebral Body Defect after Administration of Bone Marrow Stromal Cells in Rabbit Model. *Asian Spine J*.;10:1-5.
– Sadar MJ, McRuer D, Hawkins MG, Armién AG, 2015. Multifocal respiratory and vertebral mycobacteriosis in a red-tailed hawk (Buteo jamaicensis). *J Zoo Wildl Med*.; 46:150-4.
– Schook LB, Collares TV, Darfour-Oduro KA, De AK, Rund LA, Schachtschneider KM, Seixas FK, 2015. Unraveling the swine genome: implications for human health. *Annu Rev Anim Biosci*;3:219-44.
– Van Leeuwen LM, van der Kuip M, Youssef SA, de Bruin A, Bitter W, van Furth AM, van der Sar AM, 2014. Modeling tuberculous meningitis in zebrafish using Mycobacterium marinum. *Dis Model Mech*.;7:1111-22.

INFEZIONI SPONTANEE E PATOLOGIE DA *HELICOBACTER* SPP. NEGLI ANIMALI: QUALI INSEGNAMENTI PER L'UOMO?

LUCIA MINOLI, MARZIA FERRARIO, LUCILE LHOSTE, ALESSANDRO RIGAMONTI, PIERPAOLO ROMANELLI, ANDREA CAPPELLERI, MARCELLA DE MAGLIE, CAMILLA RECORDATI, EUGENIO SCANZIANI

Mouse and Animal Pathology Lab (MAPLab), Fondazione Filarete - Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Introduzione

I batteri del genere *Helicobacter* sono microrganismi spirillari, Gram-negativi, delle dimensioni di 2-10 μm, frequentemente riscontrati in differenti sedi dell'apparato digerente dell'uomo e di numerose specie animali (tabella 1, figg. 1-4), e in base alla loro sede preferenziale di colonizzazione vengono suddivisi in helicobacter gastrici ed enteroepatici. Questi microrganismi spirillari sono stati identificati con metodi istologici sin dalla fine del 1800 (Bizzozero, 1893), ma è solo nel 1983 che Warren e Marshall hanno dimostrato l'associazione di *Helicobacter pylori* con forme di gastrite cronica attiva nell'uomo (Warren e Marshall, 1983). Ora è noto che gli helicobacter possono far parte della normale flora oppure essere associati a forme infiammatorie o proliferative dell'apparato digerente dell'uomo e degli animali.

A oggi, l'infezione da *H. pylori* nell'uomo, che ha una prevalenza variabile dal 40% a oltre l'80% della popolazione a seconda dell'area geografica (Kusters *et al*., 2006), è ritenuta implicata nella genesi di diverse affezioni gastro-enteriche. Le patologie correlate a questa infezione sono riferibili a forme infiammatorie (gastrite cronica) che possono evolvere nella formazione di ulcera gastrica (e gastro-duodenale), oppure in forme neoplastiche, quali l'adenocarcinoma gastrico e il *mucosal associated lymphoide tissue-lymphoma* (MALT-lymphoma) (Kusters *et al*., 2006). Gli helicobacter enteroepatici sono stati descritti nell'intestino e nel tratto epatobiliare di numerosi ospiti, incluso l'uomo, i primati non umani, i carnivori, i roditori e gli uccelli. Anche a questo livello possono far parte della normale flora oppure essere associati a diarrea, *inflammatory bowel disease* (IBD), epatite, colangioepatite, pancreatite e carcinoma epatico (Fox, 2002, Venerito *et al*., 2015).

L'infezione da *H. pylori* è caratterizzata da una complessa interazione tra fattori di virulenza batterici, dell'ospite e ambientali. Una volta penetrato nello stomaco dell'ospite, il batterio induce alcuni eventi che risultano fondamentali nella colonizzazione e nello sviluppo dell'infezione. Innanzitutto *H. pylori* è in grado di sopravvivere alle condizioni inospitali dovute al pH acido dello stomaco grazie all'enzima batterico ureasi. L'ureasi permette di regolare il flusso citoplasmatico di ammoniaca contribuendo a innalzare il pH in prossimità del batterio, garantendone quindi la sopravvivenza. In secondo luogo, la motilità è una caratteristica essenziale per la colonizzazione. I flagelli permettono al batterio di resistere allo svuotamento gastrico e di raggiungere le cellule dell'epitelio. Mutazioni a carico dei geni codificanti componenti essenziali di questo processo (ad esempio, fliD, flagelline) aboliscono la capacità di *H. pylori* di colonizzare l'epitelio (Eaton *et al*., 1996, Kim *et al*., 1999). Infine una volta raggiunto l'epitelio, il batterio è in grado di legarsi tramite specifiche adesine (tra cui le maggiormente caratterizzate risultano essere: blood-antigen binding protein A, BabA e sialic acid-binding adhesin, SabA) ai recettori presenti sulle cellule epiteliali, garantendo la colonizzazione e l'infezione per-

sistente. Inoltre *H. pylori* rilascia una serie di tossine, tra cui la proteina CagA (*cytotoxin associated gene A*) e la citotossina vacuolizzante (VacA *vacuolating-associated gene A*) che inducono un danno tissutale. In risposta a tali eventi l'epitelio gastrico secerne chemochine e induce la risposta immunitaria innata con attivazione dei neutrofili, eventi responsabili della manifestazione clinica dell'infezione (ad esempio gastrite e ulcera) (Kao *et al*., 2015).

Estremamente comuni risultano le infezioni da *Helicobacter* spp. nelle differenti specie animali, ma il variegato quadro patologico che ne deriva, in relazione alla specie microbica e all'ospite infettato, suscita importanti riflessioni sui meccanismi patogenetici e di risposta da parte dell'ospite, che possono risultare utili nell'approfondire la patologia da *Helicobacter* spp. anche nella specie umana.

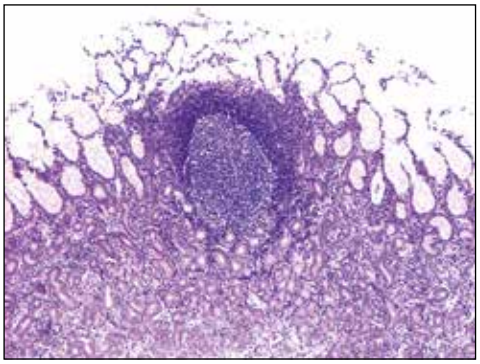


Figura 1. Suino, stomaco, regione pilorica. Iperplasia di un follicolo linfoide della mucosa gastrica. Ematossilina-Eosina, 25x.

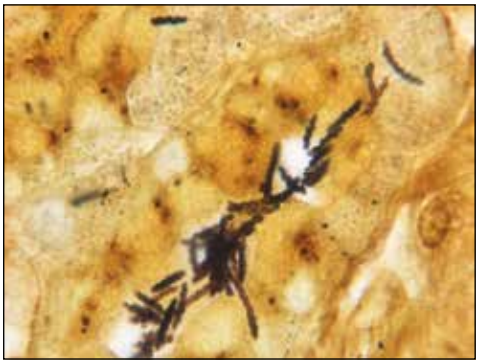


Figura 2. Cane, stomaco, regione fundica. Nel lume delle ghiandole fundiche sono osservabili microrganismi spirillari, morfologicamente assimilabili ad helicobacter. Whartin-Starry, 400x.

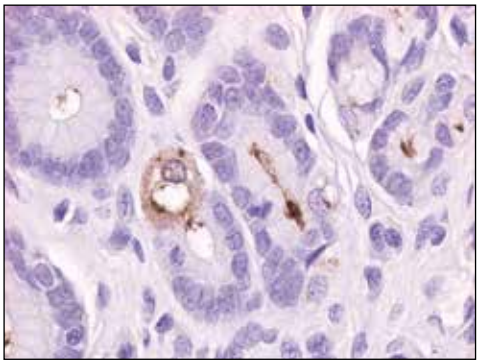


Figura 3. Cane, stomaco, regione cardiale. Mediante tecnica immunoistochimica, microrganismi del genere *Helicobacter* sono riscontrati all'interno del lume ghiandolare e nel citoplasma di una cellula. IHC per *Helicobacter* spp., 400x.

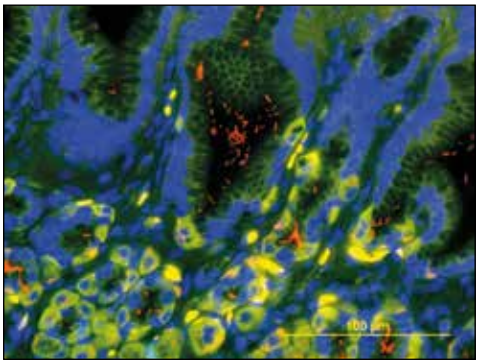


Figura 4. Cane, stomaco, regione fundica. Microrganismi del genere *Helicobacter* sono osservabili nel lume delle ghiandole gastriche. Fluorescent in situ hybridization (FISH) per *Helicobacter* spp., 400x.

Specie	Ospite	Localizzazione
H. pylori	Uomo, macaco, gatto	Stomaco
H. felis	Gatto, cane, uomo	Stomaco
H. bizzozeronii	Cane, uomo	Stomaco
H. heilmannii	Cane, gatto, uomo, scimmie, ratto	Stomaco
H. salomonis	Cane, uomo	Stomaco
H. suis	Suino, uomo	Stomaco
Candidatus H. bovis	Bovino, uomo	Stomaco
H. cynogastricus	Cane	Stomaco
H. baculiformis	Gatto	Stomaco
H. rappini	Pecora, cane, uomo, topo	Intestino, fegato, stomaco
H. bilis	Topo, ratto, cane, uomo, gerbillo	Intestino, fegato, stomaco
H. canis	Cane, uomo	Intestino, fegato
H. pullorum	Pollo, uomo	Intestino, fegato
H. cinaedi	Uomo, criceto, cane, topo	Intestino
H. fennelliae	Uomo	Intestino
H. pametensis	Uccelli, suino	Intestino
H. canadensis	Uomo	Intestino
H. westmeadii	Uomo	Intestino
H. equorum	Cavallo	Intestino
H. hepaticus	Topo, uomo, gerbillo	Intestino

Tabella 1. Principali *Helicobacter* spp. dell'uomo e degli animali domestici e rispettivo tropismo nei differenti ospiti.

Le infezioni da *Helicobacter* spp. negli animali

Primati non umani

A oggi, non è ancora stata identificata nello stomaco una specie di helicobacter specifica dei primati non umani. *H. pylori* e *H. heilmannii* sono le specie più comunemente identificate all'interno della mucosa gastrica di primati non umani e umani (Queiroz *et al*., 1990). Questi microrganismi si differenziano sulla base della morfologia batterica e della regione gastrica coinvolta. Entrambi i microrganismi sono responsabili di gastrite, ma l'incidenza e

l'intensità della patologia tendono a essere maggiori nei primati infettati da *H. pylori* (Dubois *et al*., 1991).

La prevalenza delle infezioni da *H. pylori* è alta nei giovani primati non umani (70%) (Reindel *et al*., 1999) ed è associata a gastrite acuta, iperplasia epiteliale con infiltrati linfoplasmacitici ed erosione gastrica. In corso di tali infezioni non sono stati riscontrati tuttavia casi di metaplasia intestinale della mucosa gastrica né di neoplasia. *H. heilmannii*, spesso molto numeroso nelle ghiandole fundiche e nelle cellule parietali, non è associato a un'infiammazione acuta del fondo gastrico nei primati non umani (Dubois *et al*., 1991). Sia l'incidenza nella popolazione sia la capacità di determinare gastrite da parte di *H. heilmannii* sono piuttosto basse (Queiroz *et al*., 1990).

Negli ultimi anni, alcuni helicobacter intestinali sono stati isolati e descritti in colonie di tamarino edipo *(Saguinus oedipus)* affetti da *inflammatory bowel disease* (IBD) (Saunders *et al*., 1999); così come *H. cinaedi* ed *H. macacae*, isolati nella specie macaco Rhesus (*Macaca mulatta)*, sembrano giocare un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella persistenza di colite cronica (Fox *et al*., 2001). Inoltre, infezioni persistenti da *H. macacae* nel macaco Rhesus sono state associate ad adenocarcinoma intestinale (Marini *et al*., 2010). Tuttavia sono necessari ulteriori studi per chiarire meglio il ruolo di questi helicobacter nei primati non umani.

Cane e gatto

Nei carnivori domestici sono state riscontrate molteplici specie di helicobacter gastrici. La presenza di *Helicobacter* spp. a livello di mucosa gastrica si aggira attorno all' 80-90% nel cane e tra il 40 e il 100% nel gatto, in funzione del metodo diagnostico utilizzato. Se il ritrovamento di *H. pylori* è un'evenienza rara, è invece molto frequente il riscontro di non-*H. pylori Helicobacter* (NHPH) tra i quali i principali sono *H. heilmannii*, *H. salomonis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. cynogastricus, H. baculiformis*; comuni sono le infezioni miste (Haesebrouck *et al*., 2009).

Esistono discrepanze nella letteratura sulla localizzazione specifica di questi microrganismi: alcuni autori sostengono siano di più frequente riscontro a livello del fondo e del corpo dello stomaco (Scanziani *et al*., 2001), altri che non esista una differenza significativa nella densità di *Helicobacter* spp. tra fondo, corpo e antro.

La patogenicità di *Helicobacter* spp. nel gatto e nel cane è tuttora discussa. Di più frequente riscontro sono l'infiammazione gastrica cronica (da lieve a grave, con infiltrati di cellule mononucleate, a volte con granulociti) e l'iperplasia linfoide. Tuttavia, sebbene numerosi studi descrivano con accuratezza alterazioni della mucosa gastrica in presenza di helicobacter, una chiara associazione tra l'infezione, la specie di helicobacter, la carica batterica, le alterazioni istologiche e la sintomatologia (vomito e diarrea) non è stata accertata (Prachasilpchai *et al*., 2007).

Contrariamente alla specie umana, la prevalenza di ulcere e adenocarcinomi gastrici nel gatto e nel cane è molto bassa nonostante l'elevata prevalenza di *Helicobacter* spp.: le neoplasie gastriche rappresentano meno del 1% di tutte le neoplasie maligne del cane, e il carcinoma il 42-72% delle neoplasie gastriche. Le neoplasie gastriche epiteliali sono estremamente rare nel gatto. Più elevata è invece la prevalenza di linfoma gastrico, soprattutto nel gatto. Alcuni studi hanno cercato di evidenziare l'eziologia di questa patologia nel gatto: oltre al possibile ruolo dei virus FIV e FeLV, secondo alcuni studi *H. heilmannii* potrebbe essere associato alla presenza di lesioni pre-neoplastiche della mucosa gastrica (iperplasia nodulare gastrica) (Bridgeford *et al*., 2008). Oltre agli helicobacter presenti nello stomaco, alcune specie di helicobacter, denominate entero-epatiche, colonizzano l'intestino, il fegato e le vie biliari (Greiter-Wilke *et al*., 2006; Recordati *et al*., 2009). Tra queste, le specie di più comune riscontro sono: *H. cinaedi*, *H. bilis* (comune al gatto e al cane), *H. canis* (nel cane), *H. fennelliae* e *H.*

nemistrinae (nel gatto). Nel gatto il loro significato patologico non è del tutto chiarito ma alcuni studi hanno cercato di determinare se gli helicobacter entero-epatici potessero avere un ruolo nella patogenesi delle colangiti e colangio-epatiti (Greiter-Wilke *et al*., 2006). Nel cane è stato descritto un caso di un cucciolo con epatite necrotizzante multifocale da *H. canis* (Fox *et al*., 1996) e si discute del possibile ruolo degli helicobacter enteroepatici nella patogenesi dell'IBD. Alcuni studi riportano un'associazione tra l'elevata colonizzazione dell'intestino da parte degli helicobacter entero-epatici e la presenza di fibrosi e atrofia della mucosa conseguenti a infiammazione cronica (Castiglioni *et al*., 2012).

Suino

La specie suina è nota albergare a livello gastrico microrganismi spirillari appartenenti alla specie *H. suis*, che si contraddistingue per essere il non-*H. pylori Helicobacter* (NHPH) di più frequente riscontro nell'uomo. La prevalenza dell'infezione nei suini è elevata e raggiunge valori superiori al 60% (variabili a seconda delle aree di studio) nei soggetti a fine carriera (Hellemans *et al*., 2007; Haesebrouck *et al*., 2009). È tuttavia stato osservato un incremento della prevalenza di infezione all'aumentare dell'età: i neonati risultano pressoché esenti da infezione, si osserva quindi un incremento della prevalenza dopo lo svezzamento (20% circa), fino al raggiungimento dell'80-90% nella fase di ingrasso e finissaggio (Hellemans *et al*., 2007).

L'infezione da *H. suis* è associata, nel suino, a due principali entità patologiche: la gastrite linfocitaria cronica e l'ulcera della *pars oesophagea*. La prima forma morbosa è caratterizzata dalla presenza, a carico della lamina propria della mucosa, di un infiltrato infiammatorio mononucleato che talora appare organizzato in follicoli linfoidi. Tale stato infiammatorio è osservato prevalentemente a carico della mucosa antrale (Mendes *et al*., 1991).

L'ulcera della *pars oesophagea* rappresenta invece una patologia piuttosto frequente nel suino legata a un'eziologia multifattoriale, cui sono principalmente associati fattori di tipo dietetico-nutrizionale, trofico, ormonale e infettivo. Nonostante in letteratura siano controversi i dati sul ruolo dell'infezione da *H. suis* nella genesi di tale patologia, è stata osservata, in differenti studi, una significativa associazione statistica tra la presenza di ulcera gastrica nei suini da macello e il rilievo dell'agente microbico (Quieroz *et al*. 1996; Appino *et al*. 2006). Tuttavia la definizione precisa della relazione patogenetica esistente tra queste due entità appare complicata dal fatto che l'ulcera gastrica, nella specie suina, è prevalentemente localizzata a carico dell'area di mucosa pericardiale di tipo esofageo, mentre *H. suis* è prevalentemente rinvenuto a livello di mucosa pilorica o tutt'al più fundica. Sebbene il meccanismo patogenetico non risulti ancora completamente chiarito, è ipotizzabile che *H. suis* possa agire interferendo sull'equilibrio tra la produzione di muco e la secrezione acida (Quieroz *et al*. 1996; Haesebrouck *et al*., 2009).

Bovino e piccoli ruminanti

Attualmente è stata dimostrata la presenza, a livello della porzione pilorica dell'abomaso di vitelli e bovini adulti, di un batterio spirillare denominato "*Candidatus Helicobacter bovis"* (Haesebrouck *et al*., 2009). A differenza di altre specie animali, nelle quali si osserva una correlazione tra presenza di helicobacter e comparsa di alterazioni gastriche, come ad esempio ulcere, flogosi croniche e tumori, nei ruminanti è ancora oggi sconosciuto il ruolo di questo microrganismo nella genesi di patologie gastriche (Jelinski *et al*., 1995; Haesebrouck *et al*., 2009; Hund *et al*., 2015), nonostante l'incidenza delle ulcere abomasali sia variabile tra il 2 e l'87% nei vitelli e nei bovini adulti. In particolare non è stata rilevata una significativa associazione tra presenza di helicobacter e ulcere abomasali (Hund *et al*., 2015).

Nell'ovino la presenza di *Helicobacter* spp è stata relativamente poco studiata e analizzata. Un singolo studio dimostra che l'infezione, in questo caso sostenuta da *H. pylori*, sia presente

in una bassa percentuale della popolazione ovina (Momtaz *et al*. 2013), ma non mostra relazione tra agente patogeno e alterazioni gastriche.

Al contrario di molte specie di animali domestici, nelle quali è stata dimostrata la presenza di helicobacter a livello gastrico, nella capra non si hanno riscontri di positività (Gueneau *et al*. 2002; Momtaz *et al*. 2013). Sono state formulate due ipotesi in relazione a questi risultati: la prima afferma che sia possibile una naturale resistenza della specie caprina verso l'infezione da helicobacter; la seconda, invece, sostiene che microrganismi come *Candidatus H. bovis* possano colonizzare temporaneamente l'abomaso dei caprini e renderli refrattari all'infezione da altri helicobacter (Momtaz *et al*., 2013). Ulteriori studi si renderanno necessari per verificare queste ipotesi.

Cavallo

Nella specie equina l'unica specie isolata finora è *H. equorum*, che colonizza il grosso intestino in forma asintomatica, e la cui prevalenza diminuisce con l'aumentare dell'età (Moyaert *et al*., 2009). A livello gastrico invece è stata riscontrata la presenza di microrganismi *Helicobacter-like*. Tuttavia rimane da chiarire il ruolo svolto da tali microrganismi nell'insorgenza di forme patologiche. E' stata osservata una riduzione della prevalenza dell'infezione da parte di *H. equorum* all'aumentare dell'età degli animali: se nei puledri di età inferiore ai 6 mesi si attesta oltre il 60%, nei soggetti adulti si osserva una riduzione a valori inferiori al 10%, variabili a seconda delle condizioni sanitarie e di allevamento, (Moyaert *et al*. 2008). La disparità nei tassi di infezione tra soggetti adulti e puledri può essere spiegata con l'abitudine da parte di questi ultimi di ingerire le feci della madre durante i primi mesi dopo la nascita associata alla presenza di un sistema immunitario ormai maturo nei soggetti adulti (Moyaert *et al*. 2009).

Il ruolo di *Helicobacter* spp. nel cavallo assume particolare interesse nell'eziopatogenesi dell'ulcera gastrica (EGUS – *Equine Gastric Ulcer Syndrome*). Tale lesione è di frequente riscontro nella specie equina ed è prevalentemente osservata nella porzione aghiandolare dello stomaco, in prossimità del *margo plicatus*. Sono molti i fattori eziologici e predisponenti associati allo sviluppo dell'ulcera gastrica: alimentazione incostante, dieta, esercizio, stress da trasporto, confinamento nel box e somministrazione di antinfiammatori non steroidei (Bezdekova e Futas, 2009). Analogamente a quanto accade nell'uomo, nel cavallo si ipotizza l'azione patogena di *Helicobacter* spp. soprattutto a livello di mucosa ghiandolare. Uno studio istopatologico riporta una prevalenza di helicobacter del 67% in cavalli di razza Andalusa con lesioni gastriche di tipo erosivo e ulcerativo, suggerendo l'azione patogena da parte del batterio e di conseguenza il suo probabile ruolo nello sviluppo dell'ulcera gastrica (Briceño e Sánchez. 2013). Tuttavia i risultati ottenuti da un altro studio sembrano escludere ogni ruolo del batterio nell'eziopatogenesi dell'EGUS (Bezdekova e Futas, 2009).

Roditori

Le specie di helicobacter che naturalmente infettano topi, ratti e altri roditori (criceti e gerbilli) includono undici specie formalmente nominate e due specie nominate provvisoriamente. Nel topo sono state identificate otto di queste specie a localizzazione quasi esclusivamente enteroepatica e non gastrica (tabella 2). L'infezione da *Helicobacter* spp. non è clinicamente osservabile nella maggior parte degli animali immunocompetenti; invece negli animali immunocompromessi o geneticamente modificati le manifestazioni variano da infiammazione subclinica a sviluppo di uno stato patologico conclamato. L'interesse per le infezioni enteriche da parte di helicobacter è aumentato non solo perché influiscono negativamente sui modelli di ricerca, ma anche per la loro utilità come modello di infezioni umane, includendo patologie quali: colecistiti, il carcinoma epatocellulare, batteriemia ed enteriti (Whary e Fox, 2006).

Helicobacter spp.	Tropismo	Patologie associate
H. bilis	Fegato e intestino	Tiflocoliti ed epatiti in topi immunodeficienti
H. hepaticus	Fegato, bile e intestino	Tiflocoliti in ceppi con anormalità a carico del S.I. ed epatiti sia in animali immunocompetenti sia immunodeficienti. Tumori epatici e a carico del colon in ceppi suscettibili
H. mastomyrinus	Intestino e fegato	Proctiti ed epatiti lievi
H. typhlonius	Intestino	Tiflocoliti
H. ganmani, H. rappini, H. rodentium, H. muridarum	Intestino	Non sono riportate patologie di rilievo

Tabella 2. Specie di helicobacter identificate nel topo, tropismo e patologie associate.

In particolare *H. hepaticus* è stato associato a un'epatite cronica attiva accompagnata da un'occasionale progressione a neoplasia. Sebbene nella maggior parte dei casi le infezioni siano subcliniche, gli enzimi epatici risultano frequentemente alterati (Jacobsen *et al*., 2005).

Le specie di helicobacter isolate nel ratto sono invece riportate in tabella 3.

Helicobacter spp.	Tropismo	Patologie associate
H. bilis	Intestino	Tiflocoliti in ratti nudi
H. muridarum, H. rodentium, H. trogontum e *H. typhlonius*	Intestino	Non sono riportate patologie di rilievo

Tabella 3. Specie di helicobacter isolate nel ratto, tropismo e patologie associate.

In particolare *H. bilis* è stato associato a una infiammazione di tipo proliferativo e ulcerativo a carico del grosso intestino. Alla necroscopia gli animali presentano segni di patologia lievi che includono: infiammazione perianale acuta, area perianale imbrattata e diarrea lieve. Il cieco presenta aree biancastre e inspessite, focali o diffuse, per l'infiltrazione infiammatoria da parte di linfociti, plasmacellule ed eosinofili, e per l'aumento di dimensione delle cripte. Il cieco risulta il tratto più colpito, ma possono essere presenti anche proctiti e coliti (Haines *et al*., 1998). Microrganismi spirillari sono stati osservati anche nella mucosa gastrica di ratti selvatici, nella maggior parte dei casi associata alla presenza di lesioni infiammatorie (Giusti *et al*., 1998)

In tutto il mondo le infezioni da parte di helicobacter sono endemiche nelle colonie utilizzate nella ricerca e sebbene nella maggior parte dei casi le infezioni siano subcliniche, esse

possono andare a interferire con gli esperimenti effettuati *in vivo* e portare a una errata interpretazione dei dati; per questo motivo la FELASA raccomanda l'esecuzione di un'indagine diagnostica annuale per *Helicobacter* spp. in tutti i roditori da laboratorio (Jacobsen *et al*., 2005).

H. cholecystus è stato isolato dalla cistifellea di criceti con colangiofibrosi e pancreatite, mentre *H. mesecricetorum* è stato isolato da feci di criceti Siriani non affetti da patologia gastroenterica (Patterson *et al*. 2000). Uno studio riporta l'isolamento di una nuova specie di helicobacter, per la quale è stato proposto il nome *H. aurati*, dallo stomaco e dal cieco con infiammazione di alcuni criceti Siriani (Patterson *et al*. 2000). Infine uno studio riporta un caso di adenocarcinoma associato a gastrite e metaplasia intestinale in un criceto Siriano naturalmente infettato da varie specie di helicobacter, incluso *H. aurati* (Nambiar *et al*. 2005).

Altri animali

Poco dopo la scoperta di *H. pylori* nell'uomo, un batterio spirillare successivamente nominato *H. mustelae* fu isolato dallo stomaco di alcuni furetti (Haesebrouck *et al*., 2009). Il tasso di infezione nei soggetti sotto il mese di età è pari a 0% ma aumenta fino al 100% nei soggetti adulti oltre l'anno (Solnick e Schauer, 2001). I furetti sono comunemente affetti da gastriti e ulcere gastriche; in soggetti naturalmente infettati da *H. mustelae*, si rinviene una gastrite superficiale nella regione del corpo dove il batterio colonizza la sola superficie mucosale, mentre nell'antro pilorico provoca una gastrite cronica diffusa con notevole ispessimento mucosale grazie alla capacità del microrganismo di colonizzare le ghiandole e le fossette gastriche oltre che la superfice mucosale (Haesebrouck *et al*., 2009, Solnick & Schauer, 2001). L'incidenza dell'ulcera gastrica nel furetto varia dall'1,4 al 35%; nonostante *H. mustelae* sia stato occasionalmente isolato da furetti con ulcera gastrica, il ruolo del batterio nella patogenesi di questa patologia resta ancora da chiarire (Haesebrouck *et al*., 2009, Solnick e Schauer, 2001). *H. mustelae* è stato anche messo in correlazione con lo sviluppo di tumori gastrici quali l'adenocarcinoma e il *mucosal associated lymphoid tissue-lymphoma* (MALT-*lymphoma*), ma anche in questi casi il reale ruolo del batterio deve ancora essere confermato (Haesebrouck *et al*., 2009, Solnick e Schauer, 2001).

Per quanto riguarda cetacei e pinnipedi, *H. cetorum* è la sola specie descritta ed è filogeneticamente molto vicino a *H. pylori* (Harper *et al*., 2002). Essa è stata isolata dallo stomaco, dalle feci, dalla placca dentaria e dal fluido gastrico di molti mammiferi marini: diverse specie di delfini, balene beluga e foche (Suarez *et al*., 2010). Da diversi anni si riportano casi di ulcere gastriche nei cetacei; a molti di questi casi è stata attribuita un'eziologia parassitaria (per esempio *Anisakis simplex*, *Pholeter gastrophilus* e *Braunina cordiformis*), ma in altri casi si riscontrano ulcere di eziologia non identificata (Harper *et al*., 2000). Alcuni studi suggeriscono che il batterio svolga un ruolo nello sviluppo della gastrite in questi animali, sia a livello di stomaco principale sia a livello di stomaco pilorico, e che potrebbe pertanto essere coinvolto nella patogenesi dell'ulcera gastrica (Harper *et al*., 2000). Nonostante ciò sono richieste ulteriori ricerche per stabilire se *Helicobacter* spp. sia un semplice commensale piuttosto che un patogeno opportunista o persino un patogeno primario di questi animali, e così è da chiarire il suo ruolo nello sviluppo di patologie gastroenteriche nei mammiferi marini.

H. pullorum è stato isolato per la prima volta dal cieco di broilers asintomatici e dal fegato e dall'intestino di galline ovaiole affette da epatite vibrionica (Celeen *et al*., 2007). Due diversi studi riportano prevalenze rispettivamente del 33,6% dal cieco di polli al macello e del 60% da carcasse di pollame (Celeen *et al*., 2007). *H. pullorum* e *H. canadensis* sono inoltre associati a episodi di gastroenterite nell'uomo; questo suggerisce che le specie aviarie possono fungere da *reservoirs* per la trasmissione del batterio all'uomo (Garcìa-Amado *et al*., 2013). Nonostante il frequente riscontro di questo batterio nel pollame e la sua possibile as-

sociazione a disturbi epato-enterici in questi animali, l'interazione di *H. pullorum* col suo ospite naturale resta ancora da chiarire. Per quanto riguarda altri uccelli come ad esempio il passero domestico, il gabbiano, la sterna e l'oca (Seymour *et al*., 1994, Fox *et al*., 2006), *H. pametensis*, *H. canadensis*, *H. anseris* e *H. brantae* sono specie enteriche di helicobacter frequentemente riscontrate (Garcìa-Amado *et al*., 2006). Tuttavia non si è a conoscenza del ruolo da commensale piuttosto che da patogeno del tratto gastroenterico ricoperto da *Helicobacter* spp. negli uccelli selvatici.

Considerazioni conclusive

Osservando la precedente panoramica riguardo le infezioni da microrganismi del genere *Helicobacter* nelle differenti specie animali, si evince che tale infezione è sostenuta da un elevato numero di diverse specie microbiche, talora di difficile isolamento e classificazione, caratterizzate da differente tropismo d'organo e che rispecchia la variabilità in termini di quadro patologico che ne deriva. Molteplici sono infatti le affezioni correlate alla presenza di microrganismi del genere *Helicobacter* (che spaziano da forme di infezione inapparente all'induzione di stati infiammatori, erosivo-ulcerosi, nonché, nei casi più gravi e avanzati, forme neoplastiche), che in parte riproducono il quadro patologico che si presenta nell'uomo in seguito a infezione da *H. pylori*. In quest'ottica i meccanismi patogenetici e le alterazioni patologiche che ne derivano, nelle differenti specie animali, possono offrirsi come importanti modelli di studio per approfondire i lati d'ombra che ancora contraddistinguono la corrispondente patologia umana, con particolare riferimento alle forme extragastriche (epato-biliari ed enteriche), ancora in parte sconosciute.

In secondo luogo, l'osservazione della variabile prevalenza dell'infezione in termini di specie animale e classe d'età, può rappresentare un utile punto d'indagine per quanto riguarda l'epidemiologia dell'infezione, in relazione ai fattori di rischio e possibili vie di trasmissione. Un altro fattore di rischio certamente correlato allo sviluppo di forme patologiche conclamate è la presenza di uno stato di immunodeficienza dell'ospite; questo appare infatti evidente dall'osservazione che ceppi murini a diversi livelli di immunocompetenza presentano un'inversa suscettibilità all'infezione e allo sviluppo di differenti gradi di patologia. Inoltre, il riscontro di una diminuzione della prevalenza d'infezione all'aumentare dell'età dei soggetti, riscontrato in alcune specie (cavallo e primati non umani), è allo stesso modo legato a un consolidamento del sistema immunitario.

Il rilievo invece di specie animali che paiono non essere suscettibili all'infezione, potrebbe favorire l'approfondimento e la comprensione dei meccanismi di resistenza all'infezione da *Helicobacter* spp. da parte dell'ospite.

Infine, appare importante ricordare che l'uomo è interessato, oltre che dall'infezione da parte di *H. pylori*, anche da numerose altre specie di helicobacter, classificabili nel vasto gruppo dei NHPH e che pertanto, nello studio delle patologie che ne derivano, è opportuno prendere in considerazione le forme che sussistono nelle specie animali portatrici del medesimo microrganismo, piuttosto che quelle derivanti dal ben più comune *H. pylori*.

Gli animali domestici e non, rappresentano quindi un'utile risorsa scientifica, ponendosi come modello spontaneo di studio per approfondire le conoscenze nei riguardi della patologia umana indotta da *Helicobacter* spp., secondo i differenti punti di vista sopra esposti, nonché nel potenziale utilizzo di questi nella sperimentazione di terapie innovative o lo sviluppo di sistemi profilattici (quali ad esempio vaccini), apportando inequivocabili benefici per l'uomo e per gli animali stessi.

Bibliografia

- Appino S, Guarda F, Pregel P, Amedeo S, Cutufia MA, Bellonio G, Ponzetto A., 2006. Detection of helicobacter candidatus suis by PCR in oesophagogastric ulcers of swine in Italy. Acta Vet Hung. 54(4), 517-24.
- Bezdekova B., Futas J., 2009 *Helicobacter* species and gastric ulceration in horses: a clinical study. Veterinarni Medicina, 54, 2009: 577–582.
- Bizzozero, G., 1893. Sulla presenza di batteri nelle ghiandole gastriche del cane (in Italian). Atti R. Accad. Sci. Torino. 28, 249.
- Briceño A.M., Sánchez A.M., 2013. Histopathological detection of *Helicobacter* like organisms in gastric mucosa of Spanish horses. Intern J Appl Res Vet Med. Vol. 11, No. 3.
- Bridgeford E. C., Marini R. P., Feng Y., Parry N. M. A., Rickman B., Fox J. G., 2008. Gastric Helicobacter specie sas a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. Vet. Immunol. Immunopathol. 123, 106-113.
- Castiglioni V., Vailati Facchini R., Mattiello S., Luini M., Gualdi V., Scanziani E., Recordati C., 2012. Enterohepatic Helocobacter spp. In colonic biopsies of dogs: molecular, histopathological and immunohistochemical investigations. Vet. Microbiol. 159, 107-114.
- Ceelen L. M., Decostere A., Chiers K., Ducatelle R., Maes D., & Haesebrouck F. 2007. Pathogenesis of Helicobacter pullorum infections in broilers. International journal of food microbiology, 116(2), 207-213.
- Contreras M., Morales A., Garcìa-Amado M.A., De Vera M., Bermùdez V. and Gueneau P. 2007. Detection of *Helicobacter*-like DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses. Letters in Applied Microbiology 45, 553–557.
- Dubois, A., Tarnawski A., Newell D. G., Fiala N., Dabros W., Stachura J., Krivan H., and Heman-Ackah L. M.. 1991. Gastric injury and invasion of parietal cells by spiral bacteria in rhesus monkeys. Are gastritis and hyperchlorhydria infectious diseases? Gastroenterology 100:884–891.
- Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes. Infect Immun 64, 2445e8.
- Fox J.G, Drolet R., Higgins R. et al, 1996. Helicobacter canis isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. J. Clin. Microbiol. 34, 2479-2482.
- Fox J. G., Handt L., Xu S., Shen Z., Dewhirst F. E., Paster B. J., Dangler C. A., Lodge K., Motzel S. & Klein H., 2001. Novel Helicobacter species isolated from rhesus monkeys with chronic idiopathic colitis. J Med Microbiol 50, 421–429.
- Fox J.G., Taylor N.S., Howe S., Tidd M., Xu S., Paster B.J. and Dewhirst F.E. *Helicobacter anseris* sp. nov. and *Helicobacter brantae* sp. nov., isolated from feces of resident Canada Geese in the Greater Boston Area. Applied and environmental microbiology, July 2006, p. 4633–4637. Vol. 72, No. 7
- Garcìa-Amado M.A., Sanz V., Martinez L.M., Contreras M., Lentino M. and Michelangeli F. Low occurrence of *Helicobacter* DNA in tropical wild birds, Venezuela. Journal of Wildlife Diseases, 49(4), 2013, pp. 991–995.
- Giusti A. M., Crippa L., Bellini O., Luini M., & Scanziani E. 1998. Gastric spiral bacteria in wild rats from Italy. Journal of wildlife diseases, 34(1), 168-172.
- Greiter-Wilke A., Scanziani E., Soldati S., McDonough S. P., McDonough P. L., Center S. A., Rishniw M., Simpson K. W., 2006. Association of Helicobacter with Cholangiohepatitis in cats. J. Vet. Med. 20, 822-827
- Gueneau P., Fuenmayor J., Aristimuño O. C., Cedeño S., Báez E., Reyes N., & Domìnguez-Bello M. G., 2002. Are goats naturally resistant to gastric Helicobacter infection? Veterinary microbiology, 84(1), 115-121.
- Haesebrouck F., Pasmans F., Flahou B., Chiers K., Baele M., Meyns T., Decostere A.,

Ducatelle R., 2009. Gastric Helicobacters in domestic animals and non-human primates and their significance for human health. Clin. Microbiol. Rev. 22, 202–223.
– Haines D.C., Gorelick P. L. Battles J. K., Pike K. M., Anderson R. J., Fox J. G., Taylor N. S., Shen Z., Dewhirst F. E., Anver M. R. and Ward J. M., 1998. Inflammatory large bowel disease in immunodeficients rats naturally and experimentally infected with Helicobacter bilis. Vet Pathol. 35 (3), 202-208.
– Harper C.G., Feng Y., Xu S., Taylor N.S., Kinsel M., Dewhirst F.E., Paster B.J., Greenwell M., Levine G., Rogers A. and Fox J.G., 2002. *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales.Clin. Microbiol. 40(12), 4536–4543.
– Harper C.M.G., Dangler C.A., Xu S., Feng Y., Shen Z., Sheppard B., Stamper A., Dewhirst F.E., Paster B.J. and Fox J.G., 2000. Isolation and characterization of a *Helicobacter* sp. from the gastric mucosa of dolphins, *Lagenorhynchus acutus* and D*elphinus delphis*. Applied and environmental microbiology, 66(11), 4751–4757.
– Hellemans A., Chiers K., Maes D., De Bock M., Decostere A., Haeseb-rouck F., Ducatelle R., 2007. Prevalence of 'Candidatus Helicobacter suis' in pigs of different ages. Vet. Rec. 161, 189–192.
– Hund A., Dzieciol M., Schmitz-Esser S., & Wittek T., 2015. Characterization of mucosa-associated bacterial communities in abomasal ulcers by pyrosequencing. Veterinary microbiology, 177(1), 132-141.
– Jacobsen K., Mahabir E., Brielmeier M., Wilhelm P., Seidel K. E. and Schdmidt J., 2005. Monitoring a mouse colony for Helicobacter bilis using a Helicobacter-genus-specific nested PCR. Laboratory animals LTD. 39, 400-412
– Jelinski M. D., Ribble C. S., Chirino-Trejo M., Clark E. G., & Janzen E. D., 1995. The relationship between the presence of Helicobacter pylori, Clostridium perfringens type A, Campylobacter spp, or fungi and fatal abomasal ulcers in unweaned beef calves. The Canadian Veterinary Journal, 36(6), 379.
– Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. 2016. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed J. 39, 14-23.
– Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. 1999. Molecular cloning and characterization of the Helicobacter pylori fliD gene, an essential factor in flagellar structure and motility. J Bacteriol. 181, 6969-6976
– Kusters, J. G., van Vliet, A. H., & Kuipers, E. J. 2006. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clinical microbiology reviews, 19(3), 449-490.
– Mendes E.N., Queiroz D.M.M., Rocha G.A., Nogueira A.M.M.F., Carvalho A.C.T., Lage A.P., Barbosa A.J.A., 1991. Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium (''Gastro-spirillum suis''). J. Med. Microbiol. 35, 345–348.
– Momtaz H., Dabiri H., Souod N., & Gholami M., 2014. Study of Helicobacter pylori genotype status in cows, sheep, goats and human beings. BMC gastroenterology, 14(1), 1.
– Moyaert H., Decostere A., Vandamme P., Debruyne L., Mast J., Baele M., Ceelen L., Ducatelle R. and Haesebrouck F., 2007. *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from horse faeces. Int J Syst Evol Microbiol 57, 213–218.
– Moyaert H., Haesebrouck F., Dewulf J., Ducatelle R., Pasmans F., 2008. *Helicobacter equorum* is highly prevalent in foals. Veterinary Microbiology, 133 (1-2), 190.
– Moyaert H., Pasmans F., Decostere A., Ducatelle R. & Haesebrouck F., 2009. *Helicobacter equorum*: prevalence and significance for horses and humans. FEMS Immunol Med Microbiol 57, 14–16.
– Nambiar P.R., Kirchain S. and Fox J.G., 2005.Gastritis-associated Adenocarcinoma and Intestinal Metaplasia in a Syrian Hamster Naturally Infected with *Helicobacter* Species. Vet Pathol 42, 386–390.

- Prachasilpchai W., Nuanualsuwan S., Chatsuwan T., Techangamsuwan S., Wangnaitham S., Sailasuta A., 2007. Diagnosis of Helicobacter spp. infection in canine stomach. J. Vet Sci. 8, 139-145
- Queiroz D.M., Cabral M.D., Nogueira A.M., Barbosa A.A., Rocha G., Mendes E., 1990. Mixed gastric infection by Gastrospirillum hominis and Helicobacter pylori. Lancet 336:507–508, 1990.
- Quieroz D.M., Rocha G.A., Mendes E.N., De Moura S.B., De Oliviera A.M., Miranda D., 1996. Association between Helicobacter and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. Gastroenterology 111, 19–27.
- Patterson M.M., Schrenzel M.D., Feng Y., Xu S., Dewhirst F.E., Paster B.J., Thibodeau S.A., Versalovic J. and Fox J.G., 2000. *Helicobacter aurati* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species cultured from gastrointestinal tissues of Syrian hamsters. Clin. Microbiol., 38(10), 3722–3728 .
- Recordati, C., Gualdi, V., Craven, M., Sala, L., Luini, M., Lanzoni, A. & Scanziani, E. 2009. Spatial distribution of Helicobacter spp. in the gastrointestinal tract of dogs. Helicobacter, 14(3), 180-191.
- Reindel, J. F., A. L. Fitzgerald, M. A. Breider, A. W. Gough, C. Yan, J. V. Mysore, and A. Dubois. 1999. An epizootic of lymphoplasmacytic gastritis attributed to *Helicobacter pylori* infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Vet. Pathol. 36, 1–13
- Robert P. Marini, Sureshkumar Muthupalani, Zeli Shen, Ellen M. Buckley, Cynthia Alvarado, Nancy S. Taylor, Floyd E. Dewhirst, Mark T. Whary, Mary M. Patterson and James G. Fox, 2010. Persistent infection of rhesus monkeys with 'Helicobacter macacae' and its isolation from an animal with intestinal adenocarcinoma, Journal of Medical Microbiology, 59, 961–969
- Saunders, K. E., Shen, Z., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Dangler, C. A. & Fox, J. G., 1999. Novel intestinal Helicobacter species isolated from cotton-top tamarins (Saguinus oedipus) with chronic colitis. J Clin Microbiol 37, 146–151
- Scanziani E., Simpson K. W., Monestiroli S., Soldati S., Strauss-Ayali D., Del Piero F., 2001. Histological and immunohistochemical detection of different Helicobacter species in the gastric mucosa of cats. J. Vet. Diagn. Invest. 13, 3-12
- Seymour C., Lewis R.G., Kim M., Gagnon D.F., Fox J.F., Dewhirst F.E. and Paster B.J., 1994. Isolation of *Helicobacter* strains from wild bird and swine feces. Applied and environmental microbiology, 60(3), 1025-1028.
- Solnick J.V. and Schauer D.B., 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clinical microbiology reviews, 14 (1), 59–97.
- Suàrez P., Contreras M., Fernàndez-Delgado M., Salazar V., Pena R., Michelangeli F., and Garcìa-Amado M.A., 2010. Detection of Helicobacter in the Digestive Tract of an Atlantic Spotted Dolphin (*Stenella frontalis*). Journal of Wildlife Diseases, 46(2), 622–626.
- Venerito M., Vasapolli R., Rokkas T., & Malfertheiner P., 2015. Helicobacter pylori and Gastrointestinal Malignancies. Helicobacter, 20(S1), 36-39.
- Warren J.R., Marshall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1, 1273-1275.
- Whary M.T., Fox, J.G., 2006. Detection, eradication, and research implication of Helicobacter infection in laboratory rodents. Lab Animal, 35 (7), 25.

CONFRONTO TRA PARATUBERCOLOSI DEI RUMINANTI (MALATTIA DI JOHNE) E MORBO DI CROHN DELL'UOMO

MICHELE FIASCONARO[1], BENEDETTA AMATO[1],
MARIA VITALE[2], VINCENZO DI MARCO LO PRESTI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Area Barcellona Pozzo di Gotto
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

Introduzione

La paratubercolosi o malattia di Johne (Johne's Disease - JD) dei ruminanti riveste oggi un ruolo di notevole attualità, sia per i gravi danni zoo-economici che arreca negli allevamenti, sia per il sempre maggiore interesse nei confronti delle "patologie correlate animali da reddito – uomo". Infatti, anche se al momento non tutte le opinioni sono concordanti, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), viene ritenuto implicato nella genesi del morbo di Crohn (Crohn Disease - CD) dell'uomo, in quanto viene isolato dal 50 al 75% dei pazienti affetti da questa malattia (Mishina,1996). Inoltre sembra che MAP sia implicato pure nella patogenesi di alcune malattie quali il diabete mellito tipo 1 (Paccagnini e Rosu, 2009; Cossu, 2011), il colon irritabile (Scanu, 2007) e, ipotesi più recenti, sclerosi multipla (Cossu, 2011), malattia di Parkinson (Dow, 2014), autismo (Dow, 2011), sindrome di Blau (Dow, 2010), tiroidite di Hashimoto (D'Amore, 2010) e in molte altre malattie autoimmuni. I

In questa sede verrà effettuata in particolare una trattazione di patologia comparata tra JD degli animali e CD dell'uomo.

Molti studi sono stati condotti per determinare se MAP sia coinvolto nella patogenesi del CD, una malattia infiammatoria cronica che si verifica negli esseri umani. Il suggerimento iniziale che MAP poteva essere coinvolto è basato sull'apparente somiglianza delle manifestazioni cliniche del CD con quelle della JD dei bovini causate da MAP (Dalziel, 1913;. Crohn *et al*., 1932).

Una correlazione sull'aumento dell'incidenza di CD in tutto il mondo nel corso degli ultimi 100 anni e più, con l'aumento dell'incidenza di JD in bovini da latte, ha fornito sostegno indiretto a questa ipotesi (William e Sally, 2012).

Eziologia, epidemiologia e patogenesi di paratubercolosi e morbo di Crohn

Paratubercolosi o malattia di Johne (Johne's Disease - JD)

La JD fu identificata per la prima volta nel 1895 in Germania nel bovino da Johne e Frothingham, che la scambiarono per una forma "atipica" di tubercolosi intestinale. Il primo riscontro della malattia nella pecora risale al lontano 1911 da parte di Stockman, mentre l'identificazione nella capra risale al 1924.

La paratubercolosi non viene ancora comunemente considerata come un problema di sanità pubblica ma, viste le ipotesi sul suo ruolo quale malattia zoonosica, lo potrebbe diventare molto presto.

E' una malattia infettiva contagiosa, enzootica, ad andamento cronico e infausto che colpisce sia i ruminanti domestici che quelli selvatici, causata da *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP). Si tratta di un microrganismo acido-alcol resistente, Ziehl-Neelsen positivo, classificato nel gruppo *Micobacterium avium* complex (MAC) che, come tutti i mi-

cobatteri, richiede dei tempi di crescita molto lunghi (nell'ordine di 3-4 mesi), caratteristiche che ne rendono laborioso l'isolamento in coltura pura. Inoltre, MAP è caratterizzato da un'ulteriore peculiarità che lo contraddistingue anche dagli altri micobatteri: è privo infatti di un sideroforo (micobactina) in grado di captare il ferro, indispensabile per il metabolismo, dall'ambiente circostante e trasportarlo a livello intracellulare; per tale motivo esso viene considerato un parassita intracellulare obbligato (dei macrofagi) e in coltura necessita dell'aggiunta di micobactina (Lepper, 1988).

Tramite tecniche di biologia molecolare sono state caratterizzate due diverse varianti che, sebbene dal punto di vista antigenico risultino molto simili, hanno dei distinti ospiti preferenziali:

Il tipo I (S=Sheep) colpisce ovini e caprini, è più lento e difficile nella crescita, è responsabile di lesioni particolarmente gravi e difficilmente infetta i bovini.

Il tipo II (C=cattle) è ad ampio spettro d'ospite (uomo compreso), di facile isolamento in coltura, con tempi di incubazione variabili da 1 a 4 mesi (Dohmann, 2003), difficilmente infetta gli ovini (Robbe, 2011), mentre è in gradi di infettare i caprini (con forme più severe).

Vi è infine un tipo III (Tipo intermedio), raramente isolato da bovini, ovini e caprini, molto vicino sia da un punto di visto genetico sia fenotipico al tipo I, tanto che da alcuni autori ne viene considerato un sottotipo (Stevenson, 2009).

Gli ospiti naturali del batterio sono rappresentati dai ruminanti domestici (bovini, ovini e caprini) e da quelli selvatici (cervi, bisonti, pecore delle Montagne Rocciose); quest'ultimi, nelle zone endemiche, possono costituire un serbatoio naturale della malattia (Stevenson, 2009). Sebbene raramente, il batterio è stato isolato anche dal cavallo, gatto e coniglio selvatico (Gring, 1997) in cui provoca un'enterite cronica, nonché in primati non umani (*Macaca arctoides*).

La paratubercolosi è malattia cosmopolita, maggiormente presente nelle zone ad alta vocazione zootecnica ed è presente soprattutto nelle aree umide e temperate ((Stevenson, 2009). Esiste inoltre una correlazione positiva tra la prevalenza della paratubercolosi negli allevamenti e il pH dei campi in cui pascolano gli animali: un pH acido del terreno favorirebbe infatti il reclutamento del ferro necessario per la crescita del micobatterio (Vialard, 2003).

La paratubercolosi viene considerata una malattia condizionata (Farina,1998; Vialard, 2003) in quanto qualsiasi situazione stressante, quali la gestazione, il parto, la lattazione, il trasporto, le condizioni climatiche avverse, l'inadeguato management o una qualsiasi malattia immunodepressiva concomitante, possono fungere da fattori scatenanti per la comparsa della fase clinica conclamata negli animali infetti.

La principale via d'infezione è quella oro-fecale tramite l'assunzione di colostro o alimenti e acque contaminati; la suzione di latte da capezzoli sporchi di feci rappresenta un altro importante punto critico. Nella JD, la maggiore recettività alla malattia si ha nelle prime 4-8 settimane di vita. Nei giovani soggetti, in cui i prestomaci sono ancora immaturi, il colostro e il latte contaminato vengono trasportati direttamente in abomaso attraverso la doccia esofagea e l'ambiente acido di questo organo favorisce la solubilità del ferro legato alle lattoferrine aumentandone la biodisponibilità per MAP. I micobatteri transitano quindi nel duodeno, a livello del quale la biodisponibilità di ferro aumenta grazie all'azione di una reduttasi dell'orletto a spazzola denominata citocromo b duodenale, che trasforma il ferro ferrico in ferro ferroso, onde favorirne il superamento passivo della mucosa duodenale. In questa fase anche MAP, se presente, potrebbe giovarne. Superato il duodeno, i micobatteri, una volta giunti nell'ileo terminale, sono veicolati dalle cellule M e captati dai macrofagi. A livello delle placche del Peyer passano per via linfatica ai linfonodi mesenterici (Momotani, 1998) Alcuni studi hanno dimostrato che le lesioni intestinali iniziali si instaurano in corrispondenza dei noduli linfatici aggregati dell'ileo (GALT) situati al di sotto dell'epitelio modificato costituito dalle cellule

M. I noduli linfatici dell'ileo, e in particolare della regione ileocecale, al contrario di quelli localizzati in altre porzioni di intestino, presentano uno scarso numero di aree interfollicolari T dipendenti (Siguroardottir *et al*., 2004). Le placche del Peyer, che costituiscono quindi la porta d'ingresso del bacillo, hanno il loro massimo sviluppo anatomico-funzionale alla nascita per poi regredire con l'età ((Siguroardottir *et al*., 2004); ecco perché la maggiore recettività alla malattia si ha, come detto sopra, quasi esclusivamente negli animali giovani.

Morbo di Crohn (Crohn Disease – CD)

L'eziologia del CD non è nota: si ritiene che soggetti geneticamente suscettibili presentino un'inappropriata risposta immunitaria nei confronti degli antigeni luminali intestinali (alimentari e batterici). Alterazioni della composizione della flora batterica possono influenzare il processo infiammatorio, ma vengono considerati anche: *a*) fattori psicologici (tuttora da chiarire), *b*) virus (morbillo), *c)* batteri (per MAP in particolare il suo riscontro nelle lesioni, nonché l'efficacia dei farmaci antimicobatterici in alcuni pazienti), *d)* fattori legati al microbiota intestinale (rapporto con i Linfociti T CD4+ intestinali; fattori modulanti la flora batterica), *e*) risposta immunitaria (attivazione dei Linfociti T, prevalenza della quota cellulo-mediata-IFN-γ, interleuchine quali IL-12, IL-18, IL-21; TNF-α), *f)* suscettibilità genetica (1/3 dei pazienti presenta una mutazione genetica NOD2/CARD15 nel cromosoma 16.

Negli ultimi anni si sono moltiplicati gli studi relativi al rapporto tra microbiota e sistema immunitario. Numerose malattie autoimmuni derivano da disregolazione del sistema immunitario adattativo. L'incidenza di malattie autoimmuni come la sclerosi multipla (SM), il diabete di tipo 1 , l'artrite reumatoide (RA) e le malattie infiammatorie intestinali fra cui CD, è in rapido aumento nelle società occidentali, suggerendo alterazioni da fattori ambientali che regolano il sistema immunitario adattativo. E' possibile che diete inappropriate, diffuso uso di antibiotici e altri fattori sociali nei Paesi sviluppati, non ultimo l'"eccesso di igiene" con riduzione dell'esposizione microbica (Vatanen *et al*., 2016) possano provocare uno spostamento innaturale nella composizione del microbiota 'sano', che porta a una colonizzazione microbica alterata nota come disbiosi. Se questa provoca malattia umana è ancora da dimostrare, tuttavia alcuni di questi studi suggeriscono che la composizione della comunità del microbioma umano contribuisca a formare l'equilibrio tra cellule immuneregulatorie (Treg) e cellule pro-infiammatorie T (p. es. Th17). Le prime hanno lo scopo di mitigare l'azione pro-infiammatoria delle seconde, prima che queste, nel tentativo di attaccare gli agenti patogeni, si scatenino contro i tessuti dell'ospite. Lee e Mazmanian (2010) sostengono che la produzione e il mantenimento di un livello alto di cellule Treg, in grado di contenere adeguatamente l'azione distruttiva dei linfociti pro-infiammatori, siano garantiti dal sistema immunitario previa adeguata istruzione dello stesso da parte di alcune specie batteriche, quali per esempio *Bacteroides fragilis*. Questo batterio (probabilmente ce ne sono anche altri meno conosciuti) produrrebbe una molecola, il polisaccaride A, in grado di segnalare al sistema immunitario di produrre cellule Treg. La carenza di questo batterio o di altri ad azione simile, determinata dai fattori ambientali e sociali prima segnalati, determinerebbe minore produzione di polisaccarideA e di conseguenza un sottosviluppo di sottopopolazioni di cellule Treg. Nelle persone geneticamente suscettibili di autoimmunità TH 17-mediata, questa deviazione di equilibrio potrebbe condurre a malattie autoimmuni non solo a livello intestinale ma anche sistemico (Lee e Mazmanian, 2010).

In uno studio di associazione genoma-wide (Baranzini, 2009), si è visto che il genoma di pazienti con sclerosi multipla, diabete di tipo I, artrite reumatoide e CD contiene uno spettro di varianti che sono state collegate alle malattie. Il CD potrebbe essere quindi il risultato di una interazione tra fattori genetici, fattori ambientali e microflora intestinale, con una attivazione inappropriata e cronica del sistema immunitario, verosimilmente in risposta a stimoli del microambiente intestinale(microbiota) in un individuo geneticamente suscettibile.

L'intestino è in grado fisiologicamente di autoregolare la risposta immunitaria al costante con-

tatto con antigeni alimentari, batterici, ecc. Questo non avviene nel CD. E' probabile che un fattore estrinseco inneschi una risposta infiammatoria che, normalmente autolimitante, nel CD si automantiene, determinando le modificazioni tissutali tipiche della malattia.

E' possibile che MAP possa rappresentare quindi questo fattore estrinseco in pazienti con alterazioni del microbiota intestinale.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* e morbo di Crohn

L' isolamento di MAP da pazienti con CD nel 1980 ha fornito la prima prova diretta di un suo ruolo potenziale nella patogenesi del CD (Chiodini *et al*., 1984). Nei decenni successivi sono stati effettuati numerosi studi finalizzati a individuare un rapporto fra le due malattie. Molti di questi hanno messo in evidenza la presenza di MAP in pazienti umani con CD.

Nel 2001 Sechi *et al*. hanno osservato che in circa il 75% dei pazienti con CD era presente DNA di MAP, rivelato mediante la tecnica dell'ibridazione in situ. Gli stessi autori in un successivo lavoro hanno analizzato 30 pazienti con CD e 29 controlli. Venticinque pazienti (83,3%) con CD sono risultati positivi per MAP-IS900 in PCR (p=0,000001; OR: 43,3) contro solo 3 pazienti positivi (10,3%) tra i controlli. MAP invece è cresciuto in culture provenienti da 19 pazienti con CD (63,3%) e da 3 pazienti controllo (10,3%) (p=0,00001; OR: 14,9). (Sechi *et al*., 2005).

In uno studio del 2004 Naser *et al*.. hanno isolato MAP dal 50% dei campioni di sangue dei pazienti con CD. Numerosi altri studi sono stati condotti per verificare il rapporto tra CD e JD (Feller, 2007; Abubakar, 2008; Chiodini, 2012). Non potendo riportarli tutti citiamo una rassegna di elevata qualità effettuata da Naser *et al*. (2014) in cui gli autori hanno esaminato i dati provenienti da 60 studi in tutto il mondo, che trattano l'individuazione e l'isolamento di MAP tramite PCR e tecniche di cultura. Anche se questo studio non ha esaminato il 100% di tutte le ricerche effettuate nel corso degli anni, si è visto che MAP svolge un qualche ruolo in almeno il 30-50% dei pazienti con CD. E' possibile che la mancata rilevazione di MAP in alcuni pazienti con CD possa significare che esso non abbia nessun ruolo nella loro malattia. Tuttavia questa affermazione dovrebbe essere subordinata all'utilizzo di una metodologia appropriata per il rilevamento di MAP nell'uomo. Infatti è possibile che i metodi utilizzati per la rilevazione di MAP in animali affetti da JD possano avere qualche limite per la rilevazione di MAP nell'uomo. Di conseguenza, diventa necessario mettere a punto delle metodiche più sofisticate per rilevare con più facilità MAP in pazienti con CD.

Altri fattori che possono anche limitare la rilevazione di MAP in campioni clinici in alcuni pazienti con CD includono lo stadio della malattia e un eventuale precedente trattamento con antibiotici o farmaci con attività antimicrobica. P. es. un rilevamento negativo di MAP in campioni di sangue periferico potrebbe essere correlato con una forma di CD intestinale localizzata rispetto ai casi con malattia avanzata associata a complicanze sistemiche. Quest'ultimo caso è più probabile che possa portare alla presenza di MAP in circolazione (Naser *et al*., 2014).

In un altro rassegna (Raja Atreya *et al*., 2014) gli autori concordano con Naser *et al*. (2004) che eventuali falsi negativi in pazienti con CD possono essere dovuti sia a dei limiti delle metodiche sia a problemi nella processazione dei campioni. Al contrario invece è possibile che in alcuni pazienti la presenza di DNA di MAP possa essere espressione di presenza di batteri non vitali. Pertanto il rilevamento di MAP dovrebbe essere completato dalla esame colturale, che rappresenta il gold standard.

Nel caso comunque che MAP fosse implicato nel CD, quale sarebbe il suo ruolo? Attualmente non si hanno certezze. E' possibile che MAP possa svolgere un ruolo da superantigene attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare in cui sono implicate le Hsp (Heat shock proteins) (Dow, 2008). Queste hanno il compito di mantenere le proteine della cellula avvolte in modo corretto e attive anche quando le condizioni ambientali diventano critiche. Le Hsp sono importanti non solo in caso di shock termico, ma anche in condizioni normali della cellula, in quanto aiu-

tano le altre proteine al loro corretto avvolgimento schermandole da altre proteine che potrebbero legarsi e impedire tale processo, limitando così pericolose aggregazioni di proteine immature. Durante una risposta immunitaria attiva alle infezioni, sia l'ospite sia i microrganismi sintetizzano HSP. L'ampia omologia di sequenza tra HSP umana e microbica (il 50-80% degli aminoacidi delle HSP65 micobatteriche presenta omologie con quelli delle HSP60 umane) hanno portato al concetto che le HSP siano coinvolte nell'eziologia e nella patogenesi di molti disturbi dell'immunità cellulo-mediata (Dow, 2008).

HSP di micobatteri sono risultati coinvolti in una miriade di malattie autoimmuni. Ad esempio nella patogenesi dell'artrite reumatoide, epatite autoimmune, cirrosi biliare primaria e sclerodermia. HSP65 sarebbe implicato in molteplici malattie autoimmuni sistemiche vasculite-associate, come la malattia di Kawasaki, la malattia di Behcet e l'arterite di Takayasu (Dow, 2008).

L'esistenza di epitopi in comune fra antigeni micobatterici (HSP65) e antigeni del pancreas come la decarbossilasi dell'acido glutammico decarbossilasi (glutamic acid decarboxylase - GAD) ha fatto ipotizzare che MAP possa avere un ruolo causale nel diabete tipo 1 (Sechi *et al*., 2007; Sechi *et al*., 2008). Cossu *et al*. (2011) hanno evidenziato la presenza di anticorpi contro due proteine specifiche di MAP (MptD e MAP3738c) nel siero di pazienti affetti da diabete mellito di tipo I e II. La proteina MptD è stata riconosciuta come un fattore di virulenza di MAP. Entrambe le proteine sono codificate da geni appartenenti a una specifica isola di patogenicità di MAP. Sono stati sottoposti a test ELISA 43 sieri di pazienti affetti da diabete mellito di tipo I, 56 sieri di pazienti affetti da diabete mellito di tipo II, e 48 sieri di soggetti sani per valutare la risposta immunitaria contro proteine ricombinanti di MptD e MAP3738c. I risultati hanno mostrato una risposta positiva a entrambe le proteine nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo I, mentre non sono state trovate differenze tra i pazienti affetti da diabete mellito di tipo II e i soggetti sani. I risultati quindi suggeriscono una potenziale relazione tra pazienti affetti da diabete mellito di tipo I e l'infezione batterica (Cossu *et al*., 2011).

In un altro studio sono stati analizzati 212 sieri di bambini con diabete di tipo 1 di nuova diagnosi rispetto a 57 campioni di sieri di controllo sano, al fine di rilevare una risposta immunitaria umorale alla proteina specifica del MAP (MAP3738c). Il confronto tra soggetti con diabete di tipo 1 e soggetti sani ha mostrato una più forte sieropositività dei bambini T1DM verso proteine MAP3738c rispetto ai bambini di controllo (Cossu et al., 2013).

Nel 2011 è stato pubblicato un ulteriore articolo che evidenzia una cross-reattività tra l'epitopo MAP3865c e l'antigene ZnT8 presente nelle cellule-ß del pancreas (Masala *et al*., 2011).Contemporaneamente è stato sottolineato come, in analogia a quanto già ipotizzato e pubblicato dagli stessi autori per il diabete mellito di tipo I e per il CD, alla base della malattia sia presente una predisposizione legata a specifici polimorfismi di geni che codificano per alcune proteine del sistema immunitario. L'omologia tra HSP65 micobatterica e MBP (proteina basica della mielina) sembra essere responsabile dell'aggressione autoimmunitaria verso quest'ultima, facendo ipotizzare un collegamento tra MAP e autismo (Dow , 2011). Attraverso un sistema di mimetismo molecolare, un antigene di MAP (proteina MAP 2694) sarebbe in grado di indurre una risposta autoimmune verso cellule del sistema nervoso umano, facendo ipotizzare un ruolo di MAP anche nella sclerosi multipla (Cossu *et al*., 2014). E' probabile pertanto che anche nella patogenesi del CD possa intervenire un fenomeno di mimetismo molecolare legato a MAP.

Sintomi clinici

Paratubercolosi

In corso di infezione subclinica da MAP, non si rileva una sintomatologia eclatante: l'eliminazione del batterio è intermittente, ma rilevabile tramite test diagnostico. I soggetti posso-

Fig. 1. Ovino, intestino. Paratubercolosi: lungo il margine mesenterico dell'ansa intestinale è visibile uno sfiancamento della stessa. Tale lesione è imputabile alla progressiva alterazione miocontrattile dei tratti intestinali con ispessimento parietale, che successivamente porta alla formazioni di ectasie nei *loci minoris resistentiae* (foto IZS della Sicilia, Area Barcellona P.G.)

Fig. 2. Uomo, intestino. Diverticolo (da: pictures.doccheck.com, Dr. med. K.-H. Günther)

Fig. 3. Ovino, intestino. Paratubercolosi: stenosi dell'ileo terminale (foto IZS della Sicilia, Area Barcellona P.G.)

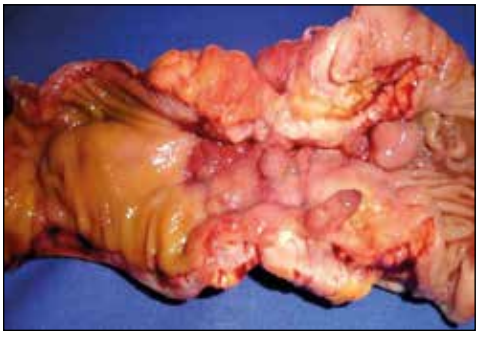


Foto 4 Uomo, intestino. Morbo di Crohn: stenosi dell'ileo terminale (da: pictures.doccheck.com, Dr. med. K.-H. Günther)

no essere ELISA-positivi se stanno passando dallo stadio subclinico a quello clinico.

La fase clinica di malattia è rilevabile tramite i comuni test ed è caratterizzata dalla comparsa della caratteristica sintomatologia: forma classica a decorso acuto (3-7 giorni) o, più spesso, cronico (1 mese - 2 anni), caratterizzata da sintomi quali diarrea intermittente o continua e refrattaria ai farmaci (legata all'enterite granulomatosa cronica con rilascio di sostanze istamino-simili), progressivo dimagramento, anemia, edema sottocutaneo ed intermandibolare, ascite (dovuti a enteropatia proteino-disperdente e linfagectasia) e calo delle produzioni.

Nella forma silente infine i sintomi sono del tutto aspecifici (anemia, ipogalassia, ipofertilità, lieve dimagrimento).

Fig. 5. Ovino, intestino. Paratubercolosi: area di ispessimento e area di sfiancamento della parete (foto IZS della Sicilia, Area Barcellona P.G.)

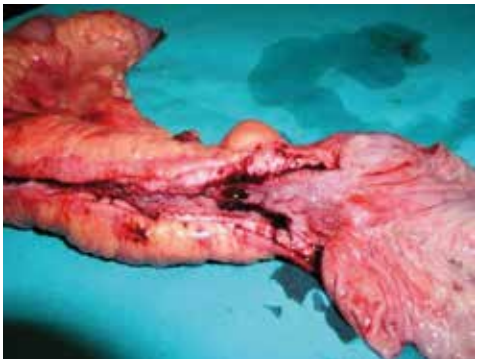


Fig. 6. Uomo, intestino. Morbo di Crohn: ispessimento di un tratto intestinale e area di sfiancamento (da: www.mariotrompetto.it)

Fig. 7. Ovino, intestino. Paratubercolosi: caratteristico aspetto della mucosa a "circonvoluzioni cerebrali" o aspetto "encefaloide" o "cerebroide" o "a scala di corda" (foto IZS della Sicilia, Area Barcellona P.G.)

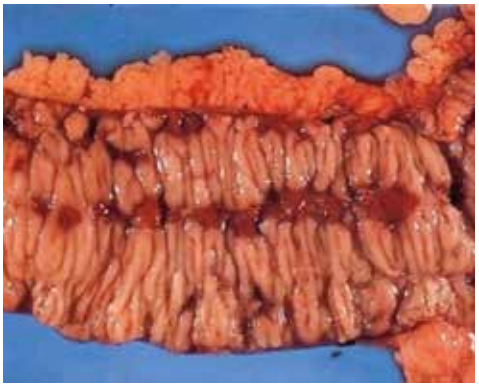


Fig. 8. Uomo, intestino. Morbo di Crohn : aspetto della mucosa intestinale (da: www.diegosegre.it)

Morbo di Crohn

Anche se vi sono delle variazioni da caso a caso, nel CD sono predominanti i dolori addominali (talvolta, se acutissimi, possono simulare un attacco d'appendicite) associati a diarrea ricorrente più o meno abbondante con o senza sanguinamento, muco e, talora, febbre. Il dolore si localizza nella sede dell'ombelico o nella parte destra dell'addome e spesso si presenta dopo i pasti. Possono comparire, seppure più raramente, dolori alle articolazioni, diminuzione dell'appetito o dimagrimento. Altri segni della malattia possono essere rappresentati dalla presenza di fistole anali e ascessi. Gli episodi di "ostruzione intestinale" (stenosi) rappresentano probabilmente la complicanza intestinale più comune. In quest'ultimo caso, i sintomi descritti possono essere associati a nausea e vomito.

Anatomia patologica

L'analogia tra le lesioni anatomo-patologiche di JD e CD ha portato a ipotizzare un nesso tra le due malattie.

Paratubercolosi

L'infezione da MAP negli animali recettivi provoca lesioni di tipo granulomatoso all'intestino e ai linfonodi meseraici. Nei soggetti cachettici si ha ascite e un'estesa atrofia gelatinosa generalizzata dei depositi di grasso. Il reperto caratteristico è l'ipertrofia della parete intestinale conseguente alla raccolta nello spessore della mucosa e della sottomucosa di ammassi di cellule epitelioidi ripiene di micobatteri. Tale infiltrazione transmurale conferisce alla mucosa intestinale il tipico aspetto di "circonvoluzioni cerebrali" o aspetto "encefaloide" o "cerebroide" e viene definito da alcuni autori "a scala di corda" (Guarda, 2002) (fig. 7) Sebbene raramente, tali lesioni possano essere così gravi da restringere notevolmente il lume intestinale e aggravare ulteriormente la sintomatologia a carico dell'intestino (figg. 3,5).

Particolarmente interessante è la reazione flogistica a livello dei vasi linfatici. In questa sede, infatti, gli stessi macrofagi, vivi o degenerati, possono causare linfangite.

In un secondo tempo questi focolai di cellule infiammatorie possono andare incontro a fenomeni di necrosi o calcificazione e quindi ingrandirsi e dare origine a focolai puntiformi biancastri, più o meno confluenti, a corona di rosario, a grappolo o cordoniformi (Fiasconaro *et al*., 2012).

L'estesa ostruzione e la conseguente stasi del circolo linfatico sono alla base della linfangectasia che quasi sempre accompagna i focolai granulomatosi.

I linfonodi mesenterici sono aumentati di 2-3 volte il volume normale, e in sezione si presentano edematosi con focolai necrotici di 0,5-5 mm, di colore biancastro, spesso calcificati. In rari casi, porzioni di intestino della lunghezza di 10-15 cm possono essere interessate da un notevole ispessimento parietale con ostruzione del lume intestinale, molto simile a quello riscontrato nell'intestino di pazienti umani affetti da CD (figg. 3,4). Questi ispessimenti. che in alcuni casi sono così imponenti da alterare la peristalsi intestinale, causano un aumento di pressione nelle porzioni non inspessite a monte della lesione, ed esitano nella progressiva formazione di sfiancamenti e diverticoli nei loci minoris resistantiae (fig. 1) (Fiasconaro *et al*., 2012). Analoghe lesioni sono state riscontrate in pazienti con CD (fig. 2).

Morbo di Crohn

Nel CD la prima lesione è a carico delle cripte della mucosa, sotto forma di un›infiammazione (criptite) e di ascessi, che progrediscono fino alla formazione di piccole ulcere aftoidi focali, di solito localizzate a livello dei noduli del tessuto linfatico. In alcuni casi queste lesioni regrediscono; in altri, il processo infiammatorio evolve con l›infiltrazione e la proliferazione di macrofagi e di altre cellule infiammatorie, che occasionalmente formano dei granulomi non caseosi con cellule giganti multinucleate.

La diffusione transmurale dell›infiammazione causa un linfedema e un ispessimento della parete intestinale, che può alla fine evolvere in una fibrosi estesa. Lo sviluppo di ulcerazioni a chiazze sulla mucosa e la combinazione di ulcere longitudinali e trasversali, con il concomitante edema della mucosa, spesso dà luogo a un caratteristico aspetto ad acciottolato o a circonvoluzioni cerebrali (fig. 8).

Il mesentere è ispessito e linfedematoso; il grasso mesenterico si estende tipicamente sulla superficie sierosa dell›intestino. I linfonodi mesenterici sono spesso aumentati di volume. L›infiammazione transmurale, le profonde ulcerazioni, l›edema, la proliferazione muscolare e la fibrosi sono responsabili della formazione di profondi tramiti e fistole, degli ascessi mesenterici e delle ostruzioni che sono le complicanze locali più importanti. Questi episodi

sono dovuti al fatto che il processo infiammatorio può creare restringimenti di alcuni tratti dell›intestino. Tali restringimenti sono «poco distensibili» e possono causare crampi, meteorismo, diverticoli (fig. 2), distensione addominale sino ad arrivare, talvolta, a un›ostruzione parziale (fig. 6) o anche a un›ostruzione completa del flusso intestinale (occlusione).

Rischi di infezione per l'uomo

L'uomo può infettarsi con MAP generalmente per via alimentare attraverso latte e derivati, carni e acqua, anche se non è da escludere una via diretta.

Diversi studi hanno affrontato il rischio di contaminazione del latte crudo con MAP (Nauta e Van der Giessen, 1998). Campioni di latte crudo di massa di impianti lattiero-caseari approvati nel Regno Unito analizzati per la presenza di MAP mediante PCR ed esame colturale sono risultati positivi alla PCR e all'esame colturale (Grant *et al*., 2002, O'Reilly *et al*., 2004). Su 26 campioni di latte di vacche clinicamente infette da paratubercolosi, 9 campioni risultarono positivi. Nello stesso studio, MAP fu isolato anche da feci, linfonodi sovra-mammari e tessuto mammario profondo (Taylor, 1981). Su 52 allevamenti di bovine da latte, analizzando 183 campioni di latte con PCR ed esame colturale,11 aziende (21,2%) risultarono positive (Arrigoni, 2011).Per ciò che riguarda il latte ovino, invece, gli studi sono meno numerosi (Grant *et al*., 2001; Djonne *et al*., 2003; Muehlherr *et al*., 2003; Singh e Vihan, 2004).

Per quanto riguarda la presenza di MAP nei prodotti caseari, gli studi più rilevanti sono quelli di Sung e Collins (2000) che suggeriscono che il trattamento termico in combinazione con 60 giorni di maturazione possa ridurre significativamente la contaminazione di MAP nel formaggio. Spahr e Schafroth (2001) hanno valutato la presenza di MAP nel formaggio a pasta dura e semidura ottenuto da latte crudo artificialmente contaminato con 104-105 CFU/ml di cellule MAP e hanno concluso che MAP potrebbe non essere in grado di moltiplicarsi nei formaggi a causa delle sue esigenze di crescita. Tuttavia un periodo di maturazione di almeno 90-120 giorni nei formaggi a latte crudo può inattivare MAP (Spahr et Schafroth, 2001).

Le carni possono essere contaminate con MAP a seguito della diffusione del patogeno nei tessuti di animali infetti o da contaminazione fecale delle carcasse con feci contaminate. Durante la macinatura l'infezione, anche se localizzata, può essere disseminata a tutto il lotto di carne. Su 140 campioni di carne macinata, Savi *et al*. (2015) hanno individuato 2 campioni positivi (1,42%) con una concentrazione presunta di 200-600 cellule MAP/gr.

Diversi studi hanno affrontato la valutazione della diffusione di MAP dal tratto gastrointestinale ad altri organi in bovini infetti da paratubercolosi (Ayele, 2004; Brady, 2008) suggerendo che la carne di bovini da latte, anche in assenza di sintomi clinici, possa essere contaminata con MAP a seguito della diffusione dell'agente patogeno. DNA di MAP è stato rilevato dalla superficie delle carcasse dopo lo scuoiamento (Meadus, 2008).

MAP inoltre è dotato di elevata resistenza nell'ambiente, dove può sopravvivere per periodi prolungati: 163 giorni in acqua di fiume, 336 giorni in acqua stagnante, 1210 giorni nel suolo, 330 giorni nelle feci, ma solo 7 giorni nelle urine (Arrigoni e Taddei, 2008).

L'acqua rappresenta la principale via di trasmissione di MAP dai bovini eliminatori agli altri ruminanti e all'uomo: MAP riesce a sopravvivere in acqua per un periodo di tempo relativamente lungo: 17 mesi a pH 7 e 14 mesi a pH compreso tra 5 e 8,5 (Collins *et al*., 2001) e fino a 485 giorni in acqua del rubinetto a temperature tra 4 e 20°C (Von Reyn *et al*., 1994).

Un'altra localizzazione di MAP nell'ambiente è rappresentata dai biofilm (Schulze-Robbeke *et al*., 1992). E' stato constatato che le sostanze organiche, come plastiche e gomma delle tubature, sono più intensamente colonizzate rispetto alle sostanze inorganiche, come vetro e rame. MAP può essere ritrovato anche nelle bottiglie di plastica utilizzate per le acque minerali (Tatchou-Nyamsi *et al*., 2008).

Infine micobatteri, tra cui MAP, sono stati rintracciati all'interno di amebe a vita libera, in

particolare nel genere *Acanthamoeba*.(Schulze-Robbeke *et al*., 1990). Ciò fa ritenere che le amebe possano rappresentare un'importante nicchia ecologica per il microrganismo all'esterno dell'animale infetto, ed essere un mezzo estremamente utile per garantirne la persistenza nell'ambiente (Cirillo *et al*., 1997).

Conclusioni

In conclusione, possiamo dire che MAP è un patogeno primario dei ruminanti in grado di infettare altre specie. Gli esseri umani come abbiamo visto sono esposti a MAP con l'acqua e gli alimenti. Il rilevamento di MAP in biopsie intestinali da pazienti con CD suggerisce che MAP sia in grado di colonizzare il tessuto intestinale umano. Tuttavia non vi sono prove evidenti che MAP possa rappresentare causa di CD come unico patogeno. Sicuramente le lesioni anatomo-patologiche sono molto spesso simili anche se non sempre uguali. Per esempio negli animali non sono state rilevate ulcerazioni, ascessi o perforazioni intestinali. Inoltre la mucosa intestinale nel CD molto più frequentemente assume aspetto ad acciottolato piuttosto che a circonvoluzioni cerebrali come nella JD. Tuttavia non bisogna dimenticare che la vita degli animali è molto breve rispetto a quella dell'uomo e che quasi mai gli animali infetti vengono sottoposti a trattamenti terapeutici come l'uomo e pertanto vengono scartati o muoiono prima che eventuali lesioni di questo tipo possano formarsi.

In merito alla patogenesi, allo stato attuale, nella JD, come si è visto, numerosi studi evidenziano un rapporto tra l'agente eziologico e le lesioni. Al contrario nel CD allo stato attuale delle ricerche le lesioni non sono collegate a nessun agente eziologico particolare. In tutti e due i casi le lesioni sono mediate dall'intervento dell'immunità cellulo-mediata, ma, nel primo caso, avverrebbero in risposta a MAP, mentre nel secondo caso in risposta all'azione variamente combinata di fattori specifici ambientali e di polimorfismi genetici. Potrebbe essere quindi plausibile l'ipotesi che l'alterazione della composizione del microbiota intestinale, con riduzione della produzione dei linfociti Treg (disbiosi) possa spostare l'equilibrio dei soggetti predisposti a favore di un'attività pro-infiammatoria, non solo a livello intestinale ma in alcuni casi anche extraintestinale e sistemica, di natura autoimmune, non direttamente collegata alla malattia intestinale. Infatti nel CD possono essere presenti fra gli altri sintomi classici, sintomi e lesioni oculari quali uveite ed episclerite. Possono essere presenti altresì malattie come una spondilo-artropatia, caratterizzata da infiammazione di una o più articolazioni (artrite) o delle inserzioni muscolari (entesite). L'artrite può interessare il ginocchio o la spalla, o le piccole articolazioni delle mani e dei piedi. L'artrite può coinvolgere anche la colonna vertebrale, portando a spondilite anchilosante o sacro-ileite.

Il CD può anche colpire la pelle con eritema nodoso e pioderma gangrenoso e il sangue, con anemia emolitica autoimmune (Danese *et al*., 2005). Invece sintomi e lesioni di questo tipo in animali con JD non vengono osservati. E' possibile pertanto che, in accordo con l'ipotesi di Lee e Mazmanian (2010) la disbiosi intestinale con carenza di produzione di linfociti Treg possa portare, in soggetti geneticamente predisposti, a un'alterazione dell'omeostasi tra linfociti Treg (anti-infiammatori) e linfociti T "aggressivi" (pro-infiammatori) con conseguenze non solo a livello intestinale ma anche extraintestinali. In questo quadro il fatto che MAP possa essere assente o presente sia in soggetti con CD o altre malattie autoimmuni sia in soggetti sani, potrebbe far ipotizzare che esso non abbia un ruolo diretto nella patogenesi del CD. Però è possibile che in pazienti a vario titolo predisposti al CD e/o con eventuale disbiosi, in cui l'equilibrio tra attività pro-infiammatoria e antiinfiammatoria può risultare compromesso, l'arrivo in intestino di MAP, grazie alla sua azione di mimetismo molecolare legato alle molecole HSP, potrebbe contribuire a spostare l'equilibrio a favore della prima, innescando l'insorgenza delle lesioni o esacerbandole se già presenti.

Bibliografia

- Abubakar I.,Myhill D.,Aliyu S.H.(2008) Detection of Mycobacterium avium s. paratuberculosis from patients with crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. Inflamm Bowel Dis 14: 401-10.
- Arrigoni N., Mauri G. Risanamento e buone pratiche di biosicurezza per prodotti sicuri e commerciabili. Settimana Veterinaria. 2011; vol. 748, inserto filiere: pp. XI-XII.
- Arrigoni M.,Taddei R.(2008) *Mycobacterium aviums subsp. paratuberculosis: caratteristiche biologiche e genotipiche*. Convegno sulla diagnostica di laboratorio in sanità animale, Roma, 29 Maggio 2008: 1-8.
- Ayele, W.Y., Bartos, M., Svastova, P., Pavlik, I. (2004) Distribution of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. Vet Microbiol 103: 209–217.
- Ayele,W.Y.,Svastova,P.,Roubal,P.,Bartos,M.,Pavlik,I(2005)-Mycobacteriumavium*subspecies*paratuberculosis*culturedfrom locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic*. Appl Environ Microbiol 71:1210–1214.
- Baranzini S.E. -The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective- Current opinion in immunology 21(6):596-605 · November 2009 DOI: 10.1016/j.coi.2009.09.014 · Source: PubMed
- Biss, M.E., Hathaway, S.C. (1995) Microbiological and visible contamination of lamb carcasses according to preslaughter presentation status: implications for HACCP. J Food Prot 58: 776–783.
- Brady C., O'Grady D., O'Meara F., Egan J., Bassett H. (2008) *Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in 21 cows from herds affected by Johne's disease*. Vet Rec. 162(5): 147-152.
- Chiodini, R.J.,Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., Thayer Jr., W.R., Coutu,J.A., 1984a. Characteristics of an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. J. Clin. Microbiol. 20, 966–97
- Chiodini R.J., Chamberlin W.M., Sarosiek J., McCallum R.W. (2012) Crohn's disease and the mycobacterioses: a quarter century later. Causation or simple association? Crit rev Microbiol 38: 52-93.
- Cirillo J.D., Falcow S., Tomprkins L.S., Bernadez L.E. (1997) Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhance. Infect. Immun. 65: 3759-3767.
- Collins M.T.et al.(2001) Ecological characteristics of M. paratuberculosis.Bulletin of the Intern.Dairy Federation 3: 32-3
- Corpa J.M., Garrido J., Garcia Marin J.F., Perez V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goat. Journal of Comparative Pathology. 2000; vol. 122: pp. 255-265.
- Cossu D., Cocco E., Paccagnini D., Masala S., Ahmed N., Frau J., Marrosu M.G., Sechi L. Association of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with Multiple Sclerosis in Sardinian Patients. Plos One 2011; vol.6.
- Cossu A., Rosu V., Paccagnini D., Pacifico A., Sechi LA. (2011) MAP3738c and MptD are specific tags of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in type I diabetes mellitus. Clin Immunol 141: 49-57.
- Cossu A., Ferrannini, Poupak Fallahi, Alessandro Antonelli, Leonardo A. Sechi. Antibodies recognizing specific Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis's MAP3738c protein in type 1 diabetes mellitus children are associated with serum Th1 (CXCL10) chemokine. Cytokine 61 (2013) 337-339.
- Dalziel, T.K., 1913. Chronic interstitial enteritis. Br. Med. J. 2, 1059.

– D'Amore M., Sabrina Lisi, Margherita Sisto, Liana Cucci and C.Thomas Dow - Molecolar identification of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in a Italian patient with Hashimoto's thyroiditis and melkersson – rosental Syndrome Journal of Medical Microbiology January 2010 vol.59 no.1 137-139
– Danese Silvio, Stefano Semeraro, Alfredo Papa, Italia Roberto, Franco Scaldaferri, Giuseppe Fedeli, Giovanni Gasbarrini, Antonio Gasbarrini, Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease, in World Journal of Gastroenterology, vol. 11, nº 46
– Djonne, B., Jensen, M.R., Grant, I.R. and Holstad, G. (2003) Detection by immunomagnetic PCR of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in milk from dairy goats in Norway. Vet Microbiol 92: 135–143.
– Donaghy J.A, Totton N.L, Rowe M.T. (2004) Persistence of Mycobacterium paratuberculosis during manufacture and ripening of cheddar cheese. Appl Environ Microbiol 70(8): 4899-4905.
– Dow T.– Cows ,Crohn's and more: is Mycobacterium paratuberculosis a superantigen? Med. Hypotheses, 71,2008, Pages 858–861.
– Dow C. T. and Jay L. E. Ellingson. Detection of Mycobacterium avium ss. Paratuberculosis in Blau Syndrome Tissues Autoimmune Dis. 2010; 2010: 127692 Published online 2010 Jun 20. doi: 10.4061/2010/127692 PMCID: PMC2989750
– Dow C. T. -Mycobacterium paratuberculosis and autism: Is this a trigger? Medical Hypotheses, Volume 77, Issue 6, December 2011, Pages 977–981
– Dow C. T.- M. paratuberculosis and Parkinson's disease – Is this a trigger,Medical Hypotheses Volume 83, Issue 6, December 2014, Pages 709–71
– Grant I.R., Rowe M.T., Dundee L., Hitchings E. (2001) Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. Int J Dairy Tech 54: 2-13.
– Guarda F., Mandelli G. Trattato di anatomia patologica. UTET, Torino, 2002; pp. 266-268.
– Farina R., Scatozza F. Trattato di malattie infettive degli animali, 2° edizione. UTET, Torino, 1998; pp. 318-322.
– Feller M., Huwiler K., Stephan R. (2007) Mycobacterium paratuberculosis subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic rewiew and meta-analysis. Lancet Infect Dis 9: 607-613.
– Fiasconaro M., Capucchio M. T., Russo M., Guarneri G., Tasca D., Giunta R., Mignacca S. A., Guarda F., Di Marco Lo Presti V.(2012) Paratubercolosi negli ovini e nei caprini: eziologia, epidemiologia, clinica e patologia. Aggiornamento della letteratura ed esperienze personali degli autori. Summa. animali da reddito 8 : 31-39
– Gring A., Stevenson K., Perez V., Pirie A.A., Grant J.M., Sharp J.M. Paratuberculosis in wild rabbits (Orictolagus cuniculus). The Veterinary Record. 1997; vol 140: pp.141-14
– Grant I.R.,et al. (2002) Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in bulk raw milk and commercially pasteuriezed cow's milk from approved dairy processing astablishments in the UK. Appl Environ Microbiol 68: 2428-2435.
– Hostetter J., Steadham E., Haynes J., Bailey T., Cheville N. Phagosomal maturation and intracellular survival of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in J774 cells. Comparative Immunology Microbiology Infection Disease. 2003; vol 26: pp. 269-283.
– Johne H.A., Frothingham L. Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberkulosis beim Rind. Deuts 18-Zeits Tiermed Vergl Pathology. 1895; vol 21: pp.438-454.
– Lee Y.K and Mazmanian S.K. - Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? - Science. 2010 Dec 24; 330(6012): 1768–1773.doi: 10.1126/science.1195568
– Lepper A.W.D., Wilks C.R. Intracellular iron storage and the pathogenesis of paratuber-

culosis. Comparative studies with other mycobacterial, parasitic or infectious conditions of veterinary importances. Journal of Comparative Pathology. 1988; vol. 98: pp. 31-53.
– Masala S., Paccagnini D., Cossu D., Brezar V., Pacifico A., Ahmed Nand Mallone R., Sechi LA. (2011) Antibodies recognizing Mycobacteriium avium paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen ZnT8 in sardinian type 1 diabetic patients. PLoS One 6: 1-10.
– Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J.E. and Stephan, R. (2003) Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. J Dairy Sci 86: 3849–3856.
– Meadus, W.J., Gill, C.O., Duff, P., Badoni, M., Saucier, L. (2008) Prevalence on beef carcasses of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis DNA. Int J Food Microbiol 124: 291–294.
– Mishina D.On the aetiology of Crohn disease.1996-Proceedings of the Nat. Academy of Sciences USA, 93, 9816–9820.
– Momotani, E. Whipple, D.L.,Thiermann, A.B. Role of M cells and macrophages in entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. Veterinary Pathology. 1988; vol. 25: pp. 131-137.
– Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J.F., 2004. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. Lancet 364, 1039–1044.
– Nauta M.J., Van der Giessen, J.W.Bvd. (1998) Human exposure to Mycobacterium avium paratuberculosis via pasteurised milk: a modelling approach. Vet Rec 143: 293–296.
– Saleh A Naser, Sudesh R Sagramsingh, Abed S Naser, Saisathya Thanigachalam- Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patientsWorld journal of Gastroenterology 2014 june 21;20(23): 74037415
– O'Reilly, C.E., O'Connor, L., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I.R., Donaghy, J., Rowe, M., O'Mahony, P. (2004) Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of Mycobacterium paratuberculosis. Appl Environ Microbiol 70: 5138–5144.
– Paccagnini D., Sieswerda L., Rosu V., Masala S., Pacifico A., Gazuoli M., Ikonomopoulos J., Ahmed N., Zanetti S., Sechi L.A. Linking Chronic Infection and Autoimmune Disease: Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis, SLC11A1 Polymorphisms and Type-1 Diabetes Mellitus. Plos One 2009; vol. 4, issue 9.
– Raja Atreya, Michael Bülteb, Gerald-F. Gerlachc, Ralph Goethed,□, Mathias W. Hornefe, Heike Köhlerf, Jochen Meensd, Petra Möbiusf, Elke Roebg, Siegfried Weissh, on behalf of the ZooMAP Consortium Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. International Journal of Medical Microbiology 304 (2014) 858–867
– Robbe –Austerman S. (2011) Control of paratuberculosis in small ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 27(3): 609- 20.
– Rosu V., Ahmed N., Paccagnini D., Gerlach G., Fadda G., Hasnain S.E., Zanetti S., Sechi L.A. Specific Immunoassays Confirm Association of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis with Type-1 but Type-2 Diabetes Mellitus. Plos One. 2009; vol. 4, issue 2.
– Savi R, Ricchi M, Cammi G, Garbarino C, Leo S, Pongolini S, Arrigoni N-Survey on the presence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ground beef from an industrial meat plant.". Vet Microbiol. 2015 Mar 20.
– Sechi, L.A., Mura, M., Tanda, F., Lissia, A., Solinas, A., Fadda, G., Zanetti, S., 2001. Identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in biopsy specimensfrom patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization. J. Clin.Microbiol. 39, 4514–4517.

– Sechi LA, Scanu AM, Molicotti P, Cannas S, Mura M, Dettori G, Fadda G, Zanetti S. - Detection and Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. Am J Gastroenterol. 2005 Jul;100(7):1529-36
– Sechi Leonardo A., Valentina Rosu, Adolfo Pacifico, Giovanni Fadda, Niyaz Ahmed and Stefania Zanetti. Humoral Immune Responses of Type 1 Diabetes Patients to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Lend Support to the Infectious Trigger Hypothesis-Clinical and vaccine immunology -2007
– Sechi LA, Paccagnini D, Salza S ,Pacifico A ,Ahmed N, Zanetti S-Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis Bacteremia in Type 1 Diabetes Mellitus: An Infectious Trigger? - Clinical Infectius Disease ,2008
– Scanu A.M., Bull T.J., Cannas S., Sanderson J.D., Sechi L.A., Dettori G., Zanetti S., Hermon-Taylor J. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis Infection in Cases of Irritable Bowel Syndrome and Comparison with Crohn's Disease and John's Disease: Common Neural and Immune Pathogenicities. Journal of Clinical Microbiology 2007; pp. 3883-3890.
– Schulze-Robbeke R., Jan-Ning B., Fischeder R. (1989) Mycobacteria in biofilms. Hyg. Um-weltmed 188: 385-390.
– Schulze-Robbeke R.,Fischeder R(1990)Growth and inactivation kinetics of mycobacteria in biofilms. IAWPCR International Sym. on Health-related Water Microbiology,Tuebingen FRG, 1-6 April, 153-156.
– Schulze-Robbeke R., Jan-Ning B., Fischeder R. (1992) Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. Tubercle and Lund Disease 73: 141-144.
– Singh, S.V. *and* Vihan, V.S. (2004) *Detection of* Mycobacterium avium *ssp*. paratuberculosis *in goat milk*. Small Ruminant Res 54*:* 231–235.
– Siguroardottir O.G., Valheim M., Press C.McL. Establishment of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. Advanced Drug Delivery Reviews. 2004; vol. 56: pp. 819-834.
– Spahr, U., Schafroth, K. (2001) Fate of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. Appl Environ Microbiol 67: 4199–4205.
– Stewart W.C., Pollock K.G., Browning L.M., Young D., Smith-Palmer A., Reilly W.J. (2005) Survey of zoonoses recorded in Scotland between 1993 and 2002. Vet Rec. 157(22): 697-702.
– Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., de Juan, L., Denham, S., Dimareli, Z., Dohmann, K., Gerlach, G.F., Heron, I., Kopecna, M., May, L., Pavlik, I., Sharp, J.M., Thibault, V.C., Willemsen, P., Zadoks, R.N., and Greig, A. (2009). Occurrence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. BMC Microbiol, 9:
– Tatchou-Nyamsi-Konig JA, Dailloux M, Block JC. Survival of Mycobacterium avium attached to polyethylene terephtalate (PET) water bottles. J Appl Microbiol. 2009;106:825–832. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04050.x.
– Taylor T.K., Wilks C.R., McQueen D.S. (1981) Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the milk of a cow with Johne's disease. Vet Rec, 109: 532-533
– Tommi Vatanen, Aleksandar D. Kostic, Eva d'Hennezel, Heli Siljander, Eric A. Franzosa, Moran Yassour, Raivo Kolde, Hera Vlamakis, Timothy D. Arthur, Anu-Maaria Hämäläinen, Aleksandr Peet, Vallo Tillmann, Raivo Uibo, Sergei Mokurov, Natalya Dorshakova, Jorma Ilonen, Suvi M. Virtanen, Susanne J. Szabo, Jeffrey A. Porter, Harri Lähdesmäki,

Curtis Huttenhower, Dirk Gevers, Thomas W. Cullen, Mikael Knip on behalf of the DIABIMMUNE Study Group, Ramnik J. Xavier, Cell, Volume 165, Issue 4, p842–853, 5 May 2016
– William C. Davis □, Sally A. Madsen-Bouterse-Crohn's disease and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: The need for a study is long overdue Veterinary Immunology and Immunopathology 145 (2012) 1–6
– Von Reyn C.F., Masloww J.N., Barber T.W., Falkinham J.O., Arbeit R.D. (1994) Persistent colonization of potable water as a source of Mycobacterium avium infection in AIDS. Lancet 343: 1137-1141.
– Whitlock R.H., Buergelt C.D. Pre-clinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 1996; vol. 12: pp. 345-355.
– Vialard J. La paratubercolosi nei piccoli ruminanti. Summa. Animali da reddito. 2003; vol. 9: pp. 51-56

LA MALARIA: DALLE PRIME SCOPERTE NEI VOLATILI ALLO STUDIO DELLA MALATTIA NELL'UOMO

FRINE ELEONORA SCAGLIONE, ENRICO BOLLO, BARTOLOMEO BIOLATTI, PAOLA PREGEL, FRANCESCA TIZIANA CANNIZZO

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Gli emosporidi sono un gruppo eterogeneo e cosmopolita di parassiti obbligati che hanno come ospiti anfibi, rettili, uccelli e mammiferi, e che utilizzano come vettori alcuni insetti ematofagi. La malaria è una delle più note emosporidiosi ed è considerata una malattia parassitaria particolarmente importante nei Paesi tropicali e subtropicali, dove ogni anno colpisce alcuni milioni di persone (Snow e Omumbo, 2006).

Le specie aviarie di *Plasmodium* hanno svolto un ruolo fondamentale come modello per gli studi sulla malaria umana, dal momento che furono le prime a essere riconosciute come parassiti intraeritrocitari (Danilewsky, 1889). Infatti, i principali studi nel campo della malariologia umana sono stati svolti sulla base di scoperte ottenute sui parassiti dei volatili (Hewitt, 1940; Garnham, 1966; Valkiūnas, 2005). Importanti furono anche le prime descrizioni di Danilewsky (1889) delle lesioni anatomo-patologiche caratteristiche della malaria negli uccelli, la scoperta della trasmissione tramite la zanzara di *P. relictum* da parte di Sir Ronald Ross (1898) (Bynum, 1998), la scoperta della merogonia esoeritrocitica di *P. elongatum* nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale degli uccelli (Raffaele, 1934) e lo sviluppo della teoria della premunizione o della resistenza alla reinfezione conferita da un'infezione malarica cronica negli ospiti aviari (Sergent e Sergent, 1956).

La malaria è una malattia antica e le prime testimonianze di questa patologia si trovano in documenti cinesi del 2700 a.C., nelle tavolette di argilla del 2000 a.C. in Mesopotamia e nei papiri egiziani del 1570 a.C.

La prima descrizione del quadro clinico risale invece agli antichi Greci: Omero, Empedocle di Agrigento e Ippocrate descrissero la tipica febbre intermittente (Cox, 2010) e associarono tale sintomatologia alla vicinanza con le paludi (Manson-Bahr, 1961).

L'etimologia di "malaria" deriva dal termine italiano "malaria", ovvero aria malsana, chiamata anche "paludismo", termine utilizzato già nel Settecento per descrivere una febbre, spesso mortale, che compariva solo d'estate (Cox, 2010) e dovuta a vapori nocivi provenienti dai terreni paludosi. Il primo autore che utilizzò il termine in inglese fu Horace Walpole nel 1740 quando, durante un soggiorno in Italia assieme al poeta Thomas Gray, scrisse in una delle sue lettere: *"A horrid thing called the 'malaria' which comes to Rome every summer and kills one"* (MacArthur, 1946). Per oltre 2500 anni si è ritenuto che la malaria fosse trasmessa da miasmi. La scoperta delle vere cause e delle dinamiche di trasmissione fu molto complicata e fu il risultato di numerose ricerche condotte su modelli umani e animali, in particolare, appunto, sui volatili (Cox, 2010).

Con la scoperta dei batteri da parte di Antoni van Leeuwenhoek nel 1676 e gli studi di Louis Pasteur e Robert Koch (1878-1879) che ne dimostrarono il ruolo come causa di malattie, si iniziarono a cercare vie alternative all'ipotesi dei miasmi come causa di tale patologia (Cox, 2010).

Nel 1716 Lancisi e successivamente nel 1831 Richard Bright descrissero i pigmenti evidenziabili negli strisci di sangue di pazienti affetti da malaria. Meckel nel 1847, Virchow e Frerichs nel 1848 e Delafied nel 1872 descrissero la presenza di pigmenti nerastri nel sangue, associati a corpi inclusi trasparenti (i parassiti) (Manson-Bahr, 1961) ritenuti però essere degli oggetti inanimati.

Charles Louis Alphonse Laveran, un ufficiale dell'esercito francese in missione in Algeria, cominciò a compiere studi e ricerche su materiale organico proveniente da milze iperplastiche di pazienti infetti nelle quali, nel 1880, individuò all'interno degli eritrociti corpuscoli di forme differenti, e osservò un parassita flagellato che ipotizzò potesse essere un organismo vivente e che denominò *Oscillaria malariae* (Manson-Bahr, 1961), scoperta che gli valse il premio Nobel per la Medicina nel 1907.

Sebbene la scoperta di Laveran fosse accolta dalla comunità scientifica con scetticismo, nel 1881 egli portò a Roma i propri preparati e li mostrò a Marchiafava, Celli, Bastianelli e Golgi (Manson-Bahr, 1961). Ettore Marchiafava, medico e senatore italiano, si dedicò dal 1880 al 1891 allo studio della malaria. Con Angelo Celli nel 1880 studiò il nuovo protozoo scoperto da Laveran, evidenziandolo nel sangue di molti pazienti affetti da febbre malarica, riconoscendone i vari stadi di sviluppo e battezzando il nuovo microorganismo "*Plasmodium*", agente eziologico della malaria (Cox, 2010).

Nel 1882-1884 Marchiafava e Bignami studiarono con il microscopio a immersione i movimenti ameboidi dei parassiti, la loro crescita e la loro moltiplicazione all'interno dei globuli rossi.

Nel 1883 il medico americano Albert King riuscì a ottenere prove concrete per poter sostenere che le zanzare avessero un ruolo nella diffusione della malaria, e i suoi studi furono alla base della dottrina zanzara-malaria (Cox, 2010). In Italia nel 1885 Camillo Golgi (Nobel per la Medicina nel 1906) dimostrò l'associazione tra la periodicità delle febbri malariche e il ciclo del plasmodio. Riuscì a provare come i due diversi tipi di febbre malarica, la terzana e la quartana, fossero provocati da due distinte specie di plasmodio, rispettivamente *P. vivax* e *P. malariae* (Corradetti, 1940).

Nello stesso anno Marchiafava chiarì la distinzione tra terzana benigna e maligna, e Danilewsky, studiando il sangue dei volatili, riconobbe i tre generi più comuni di parassiti intraeritrocitari: *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon*.

Nel 1889, ancora Camillo Golgi dimostrò che gli attacchi febbrili si verificavano nel momento in cui gli sporozoiti (stadio infettivo del ciclo del plasmodio) lisavano la parete dei globuli rossi e si liberavano nel circolo sanguigno.

Utilizzando modelli animali, soprattutto volatili, e grazie alla scoperta accidentale di Romanowsky nel 1891 della colorazione che porta il suo nome e che tutt'oggi viene utilizzata per l'osservazione degli strisci di sangue, fu possibile chiarire in breve tempo gran parte del ciclo degli emoparassiti (Cox, 2010). Ciò permise a Golgi nel 1896 di ipotizzare che la trasmissione all'uomo del plasmodio della malaria avvenisse con la puntura, durante il pasto ematico di una zanzara (Corradetti, 1940). Poco dopo, nel 1897, Ronald Ross (Nobel nel 1902) riuscì a individuare con certezza che *P. relictum* era effettivamente trasmesso da zanzare del genere *Culex* nella malaria aviaria, suggerendo che anche la malaria umana potesse essere trasmessa da vettori, ipotesi che fu in grado di dimostrare nel 1899 individuando il vettore nelle zanzare del genere *Anopheles* (Bynum, 1998; Dworkin e Tan, 2011).

Negli stessi anni venivano scoperte da parte di due studenti di medicina canadesi, William MacCallum e Eugene Opie, le fasi sessuali degli emoprotozoi nel sangue di corvo infetto da *Haemoproteus columbae*, individuandone i gametociti femminili e maschili, e potendo così teorizzare il ciclo vitale del parassita all'interno dell'ospite.

Nel 1898 i malariologi italiani Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi ed Ettore Marchiafava dimostrarono in modo conclusivo che la malaria umana è trasmessa dalle zanzare, in questo caso *Anophelinae*, e nel 1899 Giovanni Battista Grassi descrisse il ciclo di vita completo delle varie specie di *Plasmodium* (Cox, 2010).

Gli studi compiuti contemporaneamente da Mac Callum nel 1898 su milze e fegati di volatili infetti portarono all'individuazione di ulteriori stadi del parassita.

L'ipotesi di Grassi, secondo cui esisteva una fase di moltiplicazione iniziale in organi diversi dal sangue, trovò un'iniziale conferma nel 1937 dagli studi di James e Tate che ne dimostrarono la moltiplicazione all'interno del sistema reticolo-endoteliale dei polli, e da quelli di Henry Shortt e Cyril Garnham che nel 1948 dimostrarono che il parassita effettuava una prima riproduzione negli epatociti, all'interno dei quali Wojciech Krotoski (solo nel 1982) dimostrò che possono risiedere anche stadi dormienti del parassita (Cox, 2010).

I parassiti della malaria aviaria sono stati scoperti quasi contemporaneamente a quelli umani e sono considerati importanti modelli nello studio della malaria umana (Garnham, 1966). A tutt'oggi ne sono conosciute circa 24 specie, tra cui *P. relictum*, che ha contribuito maggiormente alla comprensione della trasmissione dei parassiti della malaria umana, e *P. gallinaceum* che non solo ha contribuito alla comprensione delle fasi esoeritrocitiche del parassita, ma che è stato utilizzato quale modello per la sperimentazione di chemioterapici a uso umano fino alla scoperta della malaria dei roditori avvenuta solo a metà del XX secolo (Cox, 2010). Il modello murino e lo sviluppo continuo di tecniche di coltivazione del parassita hanno fatto diminuire negli ultimi anni l'attenzione sugli emoparassiti aviari (Valkiūnas, 2005) come modello per la medicina umana, sebbene siano aumentati notevolmente gli studi sui volatili selvatici al fine di meglio comprendere i costi e gli effetti del parassitismo in animali a vita libera (Atkinson *et al*., 1991).

La malaria aviaria è una malattia comune trasmessa da insetti ematofagi degli uccelli, causata da protozoi parassiti del genere *Plasmodium*. Con lo stesso termine vengono tuttavia anche identificate le emoparassitosi dovute ai generi *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Questi tre generi, sebbene utilizzino vettori differenti, sono strettamente correlati tra di loro e presentano caratteristiche morfologiche e di sviluppo simili. Escludendo alcune rare specie di uccelli che occupano i territori artici (Bennet *et al*., 1992) e alcune specie presenti solo in isole remote (Steadman *et al*., 1990; Beadell *et al*., 2007) la maggior parte delle specie di volatili ospita ematozoi. Studi recenti condotti con l'utilizzo di tecniche biomolecolari hanno rilevato numerose differenze tra i *lineage* dei parassiti (Bensch *et al*., 2000; Ricklefs e Fallon, 2002; Beadell *et al*., 2004; Durrant *et al*., 2006; Ishtiaq *et al*., 2007; Hellgren *et al*., 2007), suggerendo la possibilità che le differenze di specie dei parassiti siano pari o superiori a quelle degli uccelli (Beadell *et al*., 2006; Hellgren *et al*., 2007).

Nonostante alcune segnalazioni, non sono riportate in letteratura gravi epizoozie da malaria aviaria nel corso degli ultimi 100 anni: la maggior parte si è verificata in uccelli nativi delle foreste Hawaiane (Warner, 1968), in Ciconiiformi selvatici in Venezuela (Gabaldon e Ulloa, 1980) e in pinguini in cattività (Fix *et al*., 1988).

Recentemente sono stati condotti numerosi studi sulla prevalenza delle infestazioni da ematozoi nei volatili, prevalentemente al fine di indagare ipotesi relative a pressioni ecologiche ed evolutive sulla selezione sessuale dei volatili, e valutare i costi del parassitismo nelle popolazioni di avifauna (Hamilton e Zuk, 1982; Kilpatrick *et al*., 2006; Gilman *et al*., 2007).

E' noto che i parassiti sono in grado di ridurre la *fitness* dei loro ospiti, potendo pertanto operare una potente forza selettiva all'interno delle popolazioni selvatiche (Poulin, 2007). Alcuni studi hanno dimostrato che riduzioni della *fitness* dovute alla presenza di parassiti in un ospite possono avere conseguenze drammatiche sulla dinamica delle popolazioni ospitanti (Hudson *et al*., 1998; Tompkins *et al*., 2002) e sulla loro evoluzione (Sheldon e Verhulst, 1996; Agnew *et al*., 2000). Ad esempio, il tipo di meccanismi di difesa che l'ospite metterà in atto nei confronti del parassita dipenderà da quali aspetti della *fitness* dell'ospite il parassita stesso andrà a ridurre e in quale momento dell'infezione e della vita dell'ospite questi si metterano in atto. Pertanto risulta essenziale comprendere come, quando e in che misura i parassiti riducano la *fitness* in condizioni naturali, per prevedere la loro influenza sull'evoluzione dell'ospite.

Da quando Hamilton e Zuk (1982) hanno utilizzato sangue parassitato di volatili (in gran parte da emosporidi appartenenti ai generi *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) per verificare la teoria della selezione sessuale mediata dai parassiti, questi ultimi sono stati sempre più utilizzati come modello per valutare come influenzano vari aspetti della biologia dell'ospite, dalla scelta del *partner* alle modificazioni delle prospettive di vita (Gustafsson *et al*., 1994; Sheldon e Verhulst, 1996; Knowles *et al*., 2009).

Sebbene l'applicazione di indagini biomolecolari abbia favorito gli studi riguardanti gli emoparassiti (Bensch *et al*., 2000; Hellgren *et al*., 2004; Waldenström *et al*., 2004; Fallon *et al*., 2005; Pérez-Tris e Bensch, 2005; Ricklefs *et al*., 2005; Hellgren *et al*., 2007), la comprensione dei loro effetti sulla *fitness* degli ospiti rimane tutt'ora poco chiara.

Gli emoparassiti aviari si sono rivelati dannosi per lo stato sanitario delle popolazioni di volatili domestici (Atkinson e van Riper, 1991; Williams, 2005) e selvatici nelle quali questi parassiti sono stati accidentalmente introdotti (van Riper *et al*., 1986; Atkinson *et al*., 2000), tuttavia i loro effetti sugli ospiti, nei quali si ritiene che esista una coevoluzione emoparassita-ospite, rimangono tuttora poco chiari.

Le emoparassitosi nei volatili sono principalmente causate da tre generi della famiglia *Plasmodiidae* appartenenti al phylum *Apicomplexa*: *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon* (Bermudez, 2003; Donovan *et al*., 2008). Sebbene siano strettamente correlati tra loro e con cicli vitali assai simili, tali parassiti presentano numerose differenze di specie (Donovan *et al*., 2008).

Il ciclo vitale è dixenico, utilizzando due differenti ospiti: i vertebrati (uccelli) e i vettori (insetti ematofagi). L'ospite definitivo è il vettore (solitamente insetti del genere *Diptera*), all'interno del quale avviene la riproduzione sessuale vera e propria, mentre i volatili rappresentano l'ospite intermedio nel quale il parassita deve compiere una o più fasi del proprio sviluppo.

Il periodo di incubazione varia tra gli undici giorni e le tre settimane.

Durante il pasto di sangue, il vettore, dando origine alla fase agamica, inocula nell'ospite intermedio gli sporozoiti, che vanno incontro a divisione asessuata all'interno delle cellule dei tessuti del volatile. In questa fase i parassiti sono indicati come meronti esoeritrocitici o schizonti. In seguito a una successiva divisione (merogonia o schizogonia) in meronti, si formano merozoiti mononucleati che rappresentano la fase asessuale di distribuzione del parassita all'interno dell'ospite. Normalmente si verificano numerose divisioni esoeritrocitiche, che permettono un marcato incremento del numero degli emoparassiti nell'ospite (Valkiūnas, 2005). I merozoiti, successivamente riversati nel sangue, invadono i globuli rossi dove possono andare incontro a una seconda fase di moltiplicazione asessuata (fase schizogonica), con conseguente produzione ciascuno di circa 8-16 merozoiti che invadono nuovi globuli rossi. All'interno degli eritrociti i merozoiti maturano in gametociti, rispettivamente femminili (macrogametociti) e maschili (microgametociti) e circolano nel sangue periferico fino a quando non vengono ingeriti da un altro insetto ematofago. All'interno del lume intestinale di quest'ultimo i gametociti maturano in gameti maschili e femminili, che tramite riproduzione sessuale generano lo zigote (ookinete); tale processo è noto come fase sporogonica. Lo zigote penetra la parete intestinale e si divide in oocisti che, tramite un'ulteriore fase di moltiplicazione, danno vita agli sporozoiti, i quali migrano verso le ghiandole salivari e verranno iniettati quando il vettore compirà un nuovo pasto di sangue su un volatile (Cox, 2010).

Tra le principali osservazioni condotte sugli emoparassiti nei volatili, sono numerose le discordanze tra i vari autori, in quanto i risultati ottenuti sono piuttosto differenti tra loro. In particolare, in letteratura, *Haemoproteus* spp. è l'emoparassita più frequentemente osservato negli uccelli, seguito da *Leucocytozoon* spp. e *Plasmodium* spp. (Murata, 2002; Savage *et al*., 2009; Carlson *et al*., 2013).

Nel corso di alcuni studi condotti presso il nostro Dipartimento su volatili stanziali della Regione Piemonte sono stati ottenuti, a seconda della specie considerata, dati concordi con quanto riportato in letteratura nel Piccione (Scaglione *et al*., 2015), e dati discordanti nella Cornacchia grigia, secondo i quali in queste specie l'emoparassita prevalente è risultato *Leucocytozoon* spp., seguito da *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. (Scaglione *et al*., 2016). Tali risultati possono essere dovuti alle differenti specie di vettori presenti sul territorio, come già suggerito in diversi studi condotti su larga scala (Savage *et al*., 2009), e alle diverse specie di volatili sui quali i vettori preferiscono alimentarsi (Börstler *et al*., 2016; Gervasi *et al*., 2016).

Sono altresì discordanti i dati riportati in letteratura circa le prevalenze di emoparassiti nei differenti gruppi di età presi in considerazione: infatti molti autori riportano assenza di differenze statisticamente significative (Castro *et al*. 2011; Scaglione *et al*., 2015; Scaglione *et al*., 2016), mentre altri riportano il dato opposto (Atkinson e Samuel; 2010; Van Oers *et al*., 2010; Knowles *et al*. 2011).

Le analisi morfometriche (rilevazione del peso, della lunghezza del becco e del tarso) sui volatili per valutare l'effetto degli emoparassiti sugli ospiti hanno spesso fornito risultati contrastanti, che però potrebbero essere spiegati con un'ininfluente pressione del parassita sulla *fitness* dell'ospite, probabilmente a causa di un adattamento evolutivo tra ospite ed emoparassita (Beadell *et al*., 2009). Va infatti ricordato che l'applicazione di indagini biomolecolari ha favorito gli studi riguardanti gli emoparassiti (Bensch *et al*., 2000; Hellgren *et al*., 2004; Waldenström *et al*., 2004; Fallon *et al*., 2005; Pérez-Tris e Bensch, 2005; Ricklefs *et al*., 2005.; Hellgren *et al*., 2007) ma la comprensione dei loro effetti sulla *fitness* degli ospiti nei quali si ritiene che esista una coevoluzione emoparassita-ospite rimane tuttora poco chiara. Infatti studi riguardanti il rapporto emoparassita-*fitness* in popolazioni di avifauna selvatica hanno fornito risultati inconcludenti o negativi (Dawson e Bortolotti, 2000; Sanz *et al*., 2001; Bensch *et al*., 2007; Marzal *et al*., 2008; Knowles *et al*., 2010).

Le discordanze dei risultati degli studi confermano la complessità dei sistemi a cui è necessario fare riferimento per giungere a conclusioni condivise. Inoltre specie diverse di volatili, emoparassiti e vettori, nonché aree geografiche diverse possono dare origine a una serie assai elevata di variabili che non consentono finora di giungere a una risposta univoca circa le interazioni ospite-parassita.

Bibliografia

- Agnew, P., Koella, J.C. e Y. Michalakis. 2000. Host life history responses to parasitism. Microb. Infect. 2: 891–896.
- Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL, e WM Iko. 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. J Wildl Dis 36: 197–204.
- Atkinson CT e MD Samuel. 2010. Avian malaria Plasmodium relictum in native Hawaiian forest birds: epizootiology and demographic impacts on apapane Himatione sanguinea. J Avian Biol 41: 357–366.
- Atkinson, C. T. 1991a. Vectors, epizootiology, and pathogenicity of avian species of Haemoproteus (Haemsporina: Haemoproteidae). Bulletin of the Society for Vector Ecology 16:109–126.
- Atkinson, C.T. e I. Van Riper. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. In: Bird–Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour (J.E. Loye & M. Zuk, eds), pp. 19–48. Oxford University Press, Oxford.
- Beadell JS, Covas R, Gebhard C, Ishtiaq F, Melo M, Schmidt BK, Perkins SL, Graves GR, e RC Fleischer. 2009 Host associations and evolutionary relationships of avian blood parasites from West Africa Int J Parasitol. Jan;39(2):257-66.
- Beadell, J.S., Atkins, C., Cashion, E., Jonker, M., e R.C., Fleischer. 2007. Immunological change in a parasite-impoverished environment: divergent signals from four island taxa. PLoS ONE 2, e896.
- Beadell, J.S., Gering, E., Austin, J., Dumbacher, J.P., Peirce, M.A., Pratt, T.K., Atkinson, C.T., e R.C. Fleischer, 2004. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. Mol. Ecol. 13, 3829– 3844.
- Beadell, J.S., Ishtiaq, F., Covas, R., Melo, M., Warren, B.H., Atkinson, C.T., Bensch, S., Graves, G.R., Jhala, Y.V., Peirce, M.A., Rahmani, A.R., Fonseca, D.M., e R.C Fleischer. 2006. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 273, 2935–2944
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H. e Pinheiro, R.T. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 267: 1583–1589.
- Bensch, S., Waldenström, J., Jonzen, N., Westerdahl, H., Hansson, B., Sejberg, D. e Hasselquist, D. 2007. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. J. Anim. Ecol. 76: 112–122.
- Bermudez AJ: 2003, Miscellaneous and sporadic protozoal infections. In: Diseases of poultry, ed. Saif YM, Barnes HJ
- Börstler, J., Jöst, H., Garms, R., Krüger, A., Tannich, E., Becker, N., Schmidt-Chanasit, J. e R. Lühken 2016. Host-feeding patterns of mosquito species in Germany. Parasit Vectors. 3: 9:318.
- Bynum, W.F., 1998. Ovary C: The Beast in the Mosquito: The Correspondence of Ronald Ross and Patrick Manson. Amsterdam Rodopi BV. Clio Med. 51, 2-1115, 1-528.
- Carlson J, Martínez-Gómez JE, Valkiūnas G, Loiseau C, Bell DA, e RN Sehgal. 2013. Diversity and phylogenetic relationships of hemosporidian parasites in birds of Socorro Island, México and their role in the re-introduction of the Socorro Dove (Zenaida graysoni). J Parasitol 99: 270-276.
- Castro I, Howe L, Tompkins DM, Barraclough RK, e D. Slaney. 2011. Presence and seasonal prevalence of Plasmodium spp. in a rare endemic New Zealand passerine (tieke or Saddleback, Philesturnus carunculatus). J Wildl Dis 47: 860-7

– Corradetti, A., 1940. Camillo Golgi e la sua opera sulla malaria, pp. 477-482.
– Cox, F.E., 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors 3, 5.
– Danilewsky, B. 1889. La Parasitologie Compare´e du sang. 1. Nouvelles Recherches sur les Parasites du Sang des Oiseaux. Darre, Kharkov, Ukraine.
– Dawson, R.D. e Bortolotti, G.R. 2000. Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American Kestrels. Auk 117: 373–380.
– Donovan TA, Schrenzel M, Tucker TA, Pessier AP, e IH Stalis. 2008. Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to Haemoproteus infection in passerine birds: eleven cases. J Vet Diagn Invest. May;20(3):304-13.
– Durrant, K.L., Beadell, J.S., Ishtiaq, F., Graves, G.R., Olson, S.L., Gering, E., Peirce, M.A., Milensky, C.M., Schmidt, B.K., Gebhard, C., e R.C Fleischer. 2006. Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. Ornithol. Monogr. 60, 98–111.
– Dworkin J, e SY Tan. 2011. Discoverer of malaria's life cycle. Singapore Med J 52:466.
– Fallon, S.M., Birmingham, E. e Ricklefs, R.E. 2005. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. Am. Nat.165: 466–480.
– Fix, A. S., C. Waterhouse, E. C. Greiner, e M. K. Stoskopf. 1988. Plasmodium relictum as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (Spheniscus magellanicus). Journal of Wildlife Diseases 24:610–619.
– Gabaldon, A., e G. Ulloa. 1980. Holoendemicity of malaria: An avian model. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74:501–507.
– Garnham PCC 1966. Malaria parasites and other haemosporidia, Blackwell Scientific Public, Oxford, 1114 pp.
– Gervasi, S.S., Burkett-Cadena, N., Burgan. S.C., Schrey, A.W., Hassan, H.K., Unnasch, T.R., e L.B. Martin. 2016. Host stress hormones alter vector feeding preferences, success, and productivity. Proc Biol Sci. 17: 283.
– Gilman, S., D. T. Blumstein, e J. Foufopoulos. 2007. The effect of hemosporidian infections on white-crowned sparrow singing behavior. Ethology 113:437–445.
– Gustafsson, L., Nordling, D., Andersson, M.S., Sheldon, B.C., e A. Qvarnström 1994 Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 29, 346(1317):323-31.
– Hamilton, W.D., Zuk, M., 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? Science 218, 384-387.
– Hellgren, O., Kristanauskiene, A., Valkiunas, G., e S Bensch. 2007. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome b lineages from six morphospecies of avian Haemoproteus (Haemosporidia: Haemoproteidae). J. Parasitol. 93, 889–896.
– Hellgren, O., Waldenström, J. e Bensch, S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. J. Parasitol. 90:797–802.
– Hewitt, R. J. 1940. Bird Malaria. The American Journal of Hygiene Monographic Series, No. 15. The JohnsHopkins Press, Baltimore, MD.
– Hudson, P.J., Dobson, A.P. e Newborn, D. 1998. Prevention of population cycles by parasite removal. Science 282: 256– 2258.
– Ishtiaq, F., Gering, E., Rappole, J.H., Rahmani, A.R., Jhala, Y.V., Dove, C.J., Milensky, C., Olson, S.L., Peirce, M.A., e R.C. Fleischer. 2007. Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: a regional survey. J. Wildl. Dis. 43, 382–398.
– Kilpatrick, A. M., D. A. LaPointe, C. T. Atkinson, B. L. Woodworth, J. K. Lease, M. E. Reiter, e K. Gross. 2006. Effects of chronic avian malaria (Plasmodium relictum) infection

on reproductive success of Hawaii Amakihi (Hemignathus virens). The Auk 123:764–774.
– Knowles SC, Wood MJ, Alves R, Wilkin TA, Bensch S, e BC Sheldon. 2011: Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. Mol Ecol 20: 1062-1076.
– Knowles, S.C., Wood, M.J., e Sheldon, B.C., 2010. Context-dependent effects of parental effort on malaria infection in a wild bird population, and their role in reproductive trade-offs. Oecologia 164(1), 87-97.
– Knowles, S.C.L., Nakagawa, S. e Sheldon, B.C. 2009. Elevated reproductive effort increases blood parasitaemia and decreases immune function in birds: a meta-regression approach. Funct. Ecol. 23: 405–415.
– MacArthur W. 1946. A brief story of English malaria. Postgrad Med J. Jul;22(249):198-200.
– Manson-Bahr P. 1961. The malaria story. Proc R Soc Med. Feb;54:91-100.
– Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J. e de Lope, F. 2008. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. J. Evol. Biol. 21: 979–987.
– Murata K. 2002. Prevalence of blood parasites in Japanese wild birds. J Vet Med Sci 64: 785-790.
– Pérez-Tris, J. e Bensch, S. 2005. Dispersal increases local transmission of avian malaria parasites. Ecol. Lett. 8: 838–845.
– Poulin, R. 2007. Evolutionary Ecology of Parasites. Princeton University Press, Princeton, NJ.
– Raffaele, G. 1934. Un ceppo italiano di Plasmodium elongatum. Rivista di Malariogia 13:3–8.
– Ricklefs, R. E., Swanson, B.L., Fallon, S.M., Martìez-Abraìn, A., Scheuerlein, A., Gray, J., e SC Latta. 2005. Community relationships of avian malaria parasites in Southern Missouri. Ecological Monographs. 75, 543-559.
– Ricklefs, R.E., e S.M., Fallon. 2002. Diversification and host switching in avian malaria parasites. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Ser. 269, 885–892.
– Sanz, J.J., Arriero, E. e Moreno, J. 2001. Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. Oecologia 126: 339–344.
– Savage AF, Robert V, Goodman SM, Raharimanga V, Raherilalao MJ, Andrianarimisa A, Ariey F, e EC Greiner. 2009: Blood parasites in birds from Madagascar. J Wildl Dis 45: 907-920.
– Scaglione, F.E., Cannizzo, F.T., Pregel, P., Perez Rodriguez, A.D. e E. Bollo. 2016. Blood parasites in hooded crows (Corvus corone cornix) in Northwest Italy. Vet Ital. 52: 111-116.
– Scaglione, F.E., Pregel, P., Cannizzo, F.T., Pérez-Rodríguez, A.D., Ferroglio, E. e E. Bollo. 2015. Prevalence of new and known species of haemoparasites in feral pigeons in northwest Italy. Malar J. 14:99.
– Sergent, Ed., e Et. Sergent. 1956. History of the concept of “relative immunity” or “premunition” correlated to latent infection. Indian Journal of Malariology 10:53–80.
– Sheldon, B.C. e Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. Trends Ecol. Evol. 11: 317–321.
– Snow RW, e JA Omumbo. 2006. Disease and mortality in sub-saharan Africa. In DT Jamison, RG Feachem, MW Makgoba, ER Bos, FK Baingana, KJ Hofman, KO Rogo (eds.), 2nd ed., Malaria World Bank, Washington, p. 195-214.
– Steadman, D.W., Greiner, E.C., e C.S., Wood. 1990. Absence of blood parasites in indigenous and introduced birds from the Cook Islands, South Pacific. Conserv. Biol. 4, 398–404.
– Tompkins, D.M., Dobson, A.P., Arneberg, P., Begon, M.E., Cattadori, I.M., Greenman,

J.V., Heesterbeek, J.A.P., Hudson, P.J., Newborn, D., Pugliese, A., Rizzoli, A.P., Rosa´ , P., Rossa, F. & Wilson, K. 2002. Parasites and host population dynamics. In: The Ecology of Wildlife Diseases (P.J. Hudson, A. Rizzoli, B.T. Grenfell, H. Heesterbeek & P.J. Dobson, eds), pp. 45–62. Oxford University Press, Oxford.
- Valkiunas, G. A. 2005. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Van Oers K, Richardson DS, Saether SA, e J Komdeur. 2010. Reduced blood parasite prevalence with age in the Seychelles Warbler: selective mortality or suppression of infection? J Ornithol 151: 69–77.
- Van Riper, C., van Riper, S.G., Goff, M.L. e Laird, M. 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. Ecol. Monogr. 56: 327–344.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D. e Ostman, O. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. J. Parasitol. 90: 191–194.
- Warner, R. E. 1968. The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna.Condor 70:101–120.
- Williams, R.B. 2005. Avian malaria: clinical and chemical pathology of Plasmodium gallinaceum in the domesticated fowl Gallus gallus. Avian Pathol. 34: 29–47.

MODELLI ANIMALI NEL CANE E IN PRIMATI NON UMANI PER LO STUDIO DELLA PATOFISIOLOGIA DELLA CARDIOMIOPATIA CHAGASICA UMANA E DI TERAPIE INNOVATIVE

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Modelli animali del morbo di Chagas, messi a punto e validati nel cane (Andrade, 1987; Barr, 1989; Braga, 2004) e in primati non umani (Lima, 1986; VandeBerg, 2002; Williams, 2009) sono l'oggetto di questo articolo. Inoltre si riporteranno i risultati ottenuti, grazie al ricorso ad alcuni di questi modelli animali, nella ricerca e sviluppo di nuovi farmaci e strategie terapeutiche innovative per la cura della patologia chagasica nell'uomo.

Modelli animali per lo studio della cardiomiopatia da morbo di Chagas nel cane

In Luisiana, Oklahoma e nel sud della California sono stati segnalati vari casi di cani, per lo più appartenenti a razze da caccia, affetti da tripanosomiasi acuta e sono stati diagnosticati anche casi di morbo di Chagas nell'uomo. Veterinari che esercitavano in queste zone hanno confrontato sintomatologia, risultati di esami strumentali, reperti necroscopici e risultanze ematochimiche, ematocliniche e istologiche ottenute in cani ammalatisi per via naturale, con gli analoghi sintomi e risultati repertati in cani infettati sperimentalmente con *T. cruzi*. Anche nei cani ammalatisi per via naturale, il cuore è risultato l'organo più colpito dalla tripanosomiasi nella fase acuta: atrio e ventricolo destri erano le cavità cardiache più interessate e si presentavano di solito moderatamente dilatate con pareti assottigliate; nel miocardio sub-endocardico si rinvenivano molteplici macchie gialle, grigie o biancastre, zone pallide striate o diffuse. L'aspetto istopatologico più evidente era una miocardite granulomatosa multifocale/diffusa, associata a un gran numero di pseudocisti contenenti amastigoti. La gravità della cardiomiopatia in questi cani era di solito direttamente proporzionale al numero degli amastigoti rinvenuti. Nella fase cronica della malattia, le principali alterazioni patologiche a carico del cuore, diagnosticate anche nell'uomo e nel cane infettato sperimentalmente, erano: marcata dilatazione del miocardio, ulteriore assottigliamento delle pareti delle cavità cardiache, infiltrati linfo-plasmacitari, marcata fibrosi e scarsezza di pseudocisti. In questa fase, la dilatazione delle cavità cardiache, che nella fase acuta era a carico della parte destra del cuore, diventava prevalente nei due ventricoli. In cani ammalatisi per via naturale, l'ECG indicava tachicardia (200 battiti/min), blocco cardiaco di I° grado con intervallo PR di 0,16 sec, ingrossamento dell'atrio sinistro (ampiezza dell'onda P=0,06 sec) e del ventricolo destro o blocco della branca destra del fascio di conduzione, durata del complesso QRS 0,08 sec, profonda onda S nelle derivazioni I, II, III e aVF e asse elettrico medio di -120°/-150°. Si segnalavano anche contrazioni unifocali ventricolari premature. La radiografia toracica indicava cardiomegalia, più grave nei ventricoli e nell'atrio sinistro. All'ecocardiografia M-mode[1] si notava assottigliamento del setto interventricolare (8,5 mm nella sistole, 7,5 mm nella diastole) e della parete libera del ventricolo sinistro (10 mm nella sistole, 8,5 mm nella diastole). Il diametro del ventricolo sinistro (50 mm nella sistole, 58 mm nella diastole) era ridotto rispetto a quello del ventricolo sinistro di un cuore normale, e la sua frazione di accorciamento, pari al 13,8%, indicava una marcata riduzione della contrattilità del miocardio. La sintomatologia clinica consisteva in debolezza, anoressia, ittero, diarrea, vomito, ipotermia, ascite e

modesta neutrofilia. L'esame necroscopico mostrava congestione del fegato e dei polmoni, oltre naturalmente a gravi lesioni cardiache consistenti nell'ingrossamento, soprattutto a carico delle cavità ventricolari, e dell'assottigliamento multifocale delle pareti ventricolari esterne e del setto interventricolare. Talora, anche l'atrio destro e l'anello della valvola mitrale erano ingranditi, con presenza di alterazioni da endocardiosi. L'esame istopatologico del muscolo cardiaco evidenziava infiltrazione multifocale di plasmacellule, di linfociti e di istiociti che rimpiazzavano gruppi focali di cardiomiociti che andavano incontro a alterazioni degenerative, quali perdita della striatura trasversale, vacuolizzazione sarcoplasmatica, lisi, frammentazione e mineralizzazione, mentre edema interstiziale e fibrosi multifocale separavano le miofibre.

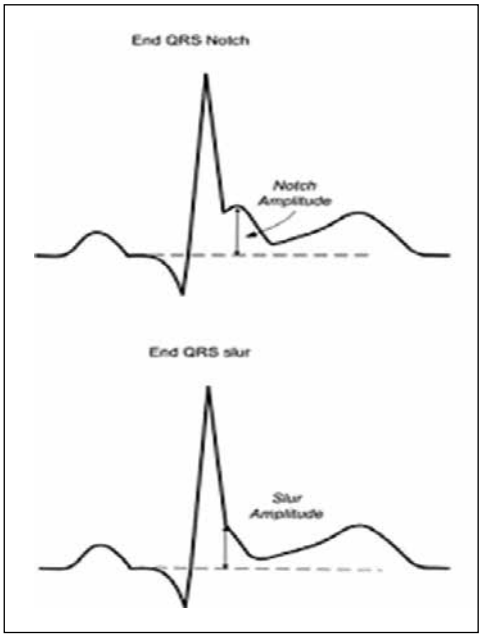


Figura 1 – In alto: end QRS notching; in basso: end QRS slurring (da: Clark e & Mcfarlane, Computing in Cardiology (2014), vol. 41: pp. 1145-1148)

L'infezione sperimentale, indotta in cani con isolati di *T. cruzi* di origine nordamericana, ha provocato una miocardite acuta 2-3 settimane dopo l'inoculo. I cani che superavano questa fase acuta non manifestavano sintomatologia cardiaca finché, molti mesi dopo l'infezione iniziale, non sviluppavano una miocardite dilatativa cronica seguita da una progressiva, generalizzata dilatazione cardiaca e crescenti aritmie ventricolari. Entro 6-8 mesi dall'infezione, aritmie e dilatazione cardiaca spesso si aggravavano al punto che un'insufficienza cardiaca sinistra precedeva segni di insufficienza cardiaca destra, con esiti invariabilmente fatali. Un quadro sovrapponibile a quello visto nei cani ammalati per via naturale si riscontrava, quindi, anche nei cani infettati sperimentalmente, i cui dati clinici, l'ecocardiogramma M-mode, le radiografie toraciche e le anomalie dell'ECG confermavano il grave ingrossamento bi-ventricolare e la cardiomiopatia dilatativa.

Sebbene la fibrillazione atriale sia l'aritmia più frequente nelle cardiomiopatie dilatative, anche in questi cani sono state registrate contrazioni ventricolari unifocali premature, secondarie a insufficienza cardiaca congestizia o a ischemia miocardica. Nelle zone nelle quali *T. cruzi* è endemico, la diagnosi di tripanosomiasi dovrebbe scaturire da una diagnosi differenziale nei cani con segni di dilatazione biventricolare, a causa delle marcate somiglianze del quadro clinico tra la cardiomiopatia dei cani infettati naturalmente dal tripanosoma e quella dei cani affetti da cardiomiopatie dilatative di diversa eziologia. Le più comuni anomalie dell'ECG nella tripanosomiasi indotta sperimentalmente nel cane erano: diminuzione del voltaggio del complesso QRS, *end QRS slurring* (ritardo della transizione da QRS al tratto ST) (fig. 1, in basso) ed *end QRS notching* (deflessione positiva, o innalzamento, della parte terminale di QRS (fig. 1, in alto) - interpretabili come indicatori di una ripolarizzazione precoce associata a aritmie cardiache potenzialmente letali - blocco della branca destra del fascio di conduzione e blocco cardiaco di I° grado (allungamento del tratto PR).

Il trattamento anti-parassitario non ha sortito effetti terapeutici sia nei cani ammalatisi

cronicamente sia in quelli infettati sperimentalmente, in quanto i comuni farmaci tripanocidi sono poco efficaci contro il parassita nella fase cronica: nifurtimox e benznidazolo, in uso da oltre 40 anni, hanno una qualche efficacia nella fase acuta, ma in quella cronica gli effetti collaterali prevalgono su quelli terapeutici; inoltre, sono praticamente inutili nella fase cronica, perché la rimozione dei tripomastigoti dal circolo può non influenzare il corso clinico della patologia nei casi cronici.

Concludendo, nel cane la patologia spontanea e quella indotta sono risultate sovrapponibili, avvalorando il modello animale di patologia sperimentale inducibile in questa specie (Barr, 1989).

Su campioni di sangue prelevati da 54 cani (21 maschi e 33 femmine) provenienti da villaggi rurali di zone endemiche della Repubblica di Costa Rica, di età compresa tra 3 mesi e 10 anni, sono stati eseguiti test sierologici di immunofluorescenza e di emoagglutinazione indirette e ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) per rilevare la presenza di antigeni e anticorpi specifici: 15 cani (27,7%; 6 di razza e 9 meticci) avevano anticorpi contro *T. cruzi* e, in 3 di questi soggetti, è stata dimostrata, con xenodiagnosi² o con emocultura, la presenza del tripanosoma; tutti i cani positivi, eccetto 1, e 9 cani negativi (controlli) mostravano, ai raggi X e all'ECG, cardiomegalia di diversa gravità e alterazioni dell'ECG compatibili con il morbo di Chagas. Sorprendentemente, l'esame sierologico di 50 persone che abitavano con questi cani, in case infestate dal vettore *Triatoma dimidiata*, ha fornito risultati negativi. La situazione epidemiologia dell'uomo, differente rispetto a quella del cane, supporta l'ipotesi che i cani contraggano l'infezione prevalentemente per via orale (per ingestione delle deiezioni infette del vettore triatomina, sparse sul terreno) che è una via di infezione più efficiente rispetto al meccanismo di trasmissione del tripanosoma all'uomo che si realizza per lo più per via transmucosale e transdermale.

I cani sono importanti serbatoi domestici di *T. cruzi* e frequenti vittime della patologia: come abbiamo visto, sviluppano alterazioni patologiche croniche molto simili a quelle rilevate nel paziente umano e la patologia chagasica, in questa specie, presenta le caratteristiche fasi, acuta e cronica, intervallate da una fase asintomatica indeterminata, che si riscontrano anche nell'uomo. Questi risultati confermano che i cani sono un valido modello animale per lo studio dell'evoluzione della patologia durante il corso della malattia e sentinelle naturali nella sorveglianza di aree sottoposte a campagne per il controllo/l'eradicazione delle triatomine vettrici (Montenegro, 2002).

Raramente *T. cruzi* viene individuato in preparazioni istologiche ottenute dal cuore di pazienti chagasici o di animali sperimentali. Ciò fa pensare che *T. cruzi* non giochi un ruolo fondamentale diretto nella miocardite cronica, considerata essenzialmente un processo autoimmune. Tuttavia, quando antigeni di *T. cruzi* sono stati trovati sia come amastigoti diffusi nel citoplasma dei macrofagi sia come strutture rotondeggianti, simili a amastigoti e liberi nell'interstizio, si è riscontrato un importante infiltrato infiammatorio. Al contrario, in assenza di parassiti individuabili, era presente solo un modesto infiltrato nel miocardio. Questi risultati non permettono di escludere che l'autoimmunità abbia un ruolo nella cardiopatia chagasica cronica. Tuttavia, l'impressionante correlazione tra la presenza di antigeni di *T. cruzi* e la severità dell'infiltrato infiammatorio del sito sono a favore di un ruolo diretto del parassita nel perpetuare l'infiammazione del miocardio nel morbo di Chagas.

…**nella scimmia *Macaca mulatta***

Si è spesso ipotizzato che l'invasione intracellulare da parte di *T. cruzi*, con rilascio di antigeni intracellulari miocardici durante l'infezione, sia cruciale per la patogenesi della miocardite cronica chagasica. Tuttavia nelle regioni endemiche del morbo di Chagas, l'incidenza della

miocardite chagasica acuta è bassa tra gli individui infetti, mentre l'incidenza della miocardite chagasica cronica è relativamente elevata. Pertanto, o la miocardite chagasica acuta complica raramente l'infezione sostenuta da *T. cruzi* e non è rilevante per la patogenesi della miocardite chagasica cronica, o raramente menoma la funzione ventricolare sinistra, rimanendo asintomatica. Per chiarire questo punto, un isolato di *T. cruzi*, ottenuto da un paziente affetto dal morbo di Chagas, è stato inoculato nella sub-congiuntiva di 6 macachi rhesus (*Macaca mulatta*, 7,5x10³ parassiti inoculati/scimmia). La parassitemia è stata monitorata e, settimanalmente per 10 settimane, sono stati eseguiti due ecocardiogrammi bi-dimensionali, per quantificare la dimensione globale e la funzione ventricolare sinistre, tramite la misura della *end-diastolic area* (EDA: area della sezione trasversale del ventricolo sinistro, a fine diastole) e della *fractional area change (*FCA: cambiamento frazionale dell'area della sezione trasversale della cavità ventricolare). La funzione ventricolare regionale sinistra è stata valutata visivamente sugli ecocardiogrammi bi-dimensionali e l'estensione della miocardite acuta è stata quantizzata all'esame necroscopico. Tutte le 6 scimmie presentavano il caratteristico rigonfiamento periorbitale unilaterale (che nell'uomo si chiama *Romaña's sign*[3] o chagoma (fig. 2) e parassitemia rilevabile già nella seconda settimana dall'infezione sperimentale, con valori medi di picco di 1,8 x 10^5 parassiti/ml a 6 settimane dall'inoculo di *T. cruzi*. Nell'8ª settimana, 4 scimmie su 6 avevano perso in media il 12% del peso corporeo e mostravano un comportamento apatico. Tra la 9ª e la 10ª settimana, 3 scimmie sono morte, mentre le 3 sopravvissute, che mostravano nistagmo e sopore, sono state sottoposte a eutanasia all'11ª settimana. Le dimensioni del ventricolo sinistro, calcolate con l'EDA, sono rimaste invariate, rispetto al controllo, fino all'ultimo esame, eseguito nelle 12 ore precedenti la morte (EDA: dai 2,6±0,7 cm² del controllo, ai 2,6±0,8 cm² e 2,5±0,3 cm² alla 10ª e 11ª settimana). Similmente, la funzione globale del ventricolo sinistro, calcolata con la FCA, è rimasta invariata rispetto al valore del controllo: da 80,7±5,3 (controllo), a 74,2±3,3% nella 10ª e 72,7±2,3 nell'11ª settimana). All'esame necroscopico, tutte le 6 scimmie presentavano miocardite acuta di diversa gravità (2 lieve, 1 moderata, 3 grave) e 2 avevano una grave pancardite, con intensa infiltrazione interstiziale linfocitaria, in assenza di fibrosi, e abbondanti amastigoti di *T. cruzi* (1 annidamento/cm² di sezione cardiaca). Altre evidenze alla necroscopia comprendevano un'infiltrazione linfocitaria esofagea e, in una scimmia, una grave forma di meningoencefalite. Concludendo, la miocardite chagasica acuta può essere grave dopo l'infezione con *T. cruzi*, e tuttavia non creare deterioramento della funzione ventricolare sinistra a riposo (EDA ed FCA invariate), nonostante la massiccia invasione di tripanosomi (Lima, 1986).

Fig. 2. Romaña's sign (da: bioscience.org)

…nel babbuino (*Papio cynocephalus*)

La criticità nella ricerca sul morbo di Chagas è l'assenza di un modello animale ideale, in un organismo non umano, che contragga la patologia chagasica in modo naturale, replichi tutti gli aspetti clinici e fisiopatologici riscontrati nell'uomo e fornisca le informazioni necessarie alla diagnostica, alla cura e alla prevenzione.

Topi e cani sono modelli utili per ricerche sul morbo di Chagas, ma ambedue presentano limiti intrinsici: i topi possono essere sperimentalmente infettati con *T. cruzi* e il loro sistema im-

Fig. 3. *Papio cynocephalus* (Babbuino) (da: Wikipedia)

munitario, che ha molte somiglianze con quello umano, reagisce all'infezione, ma manifestano una sintomatologia che, in parte, differisce dalla cardiomiopatia umana e non sviluppano megaesofago con acalasia[4] e megacolon, che sono alterazioni tipiche della patologia umana; i cani infettati naturalmente, o sperimentalmente, sono la specie che meglio riproduce, in tutte le sue manifestazioni, la forma cardiaca del morbo di Chagas: mostrano la classica cardiomiopatia, con diffusa miocardite, cardiomegalia, aritmie e insufficienza cardiaca progressiva tipiche dell'infezione cronica umana, ma dagli umani differiscono per genetica e fisiologia.

Partendo da un rapporto della *Southwest Foundation for Biomedical Research* (SFBR, San Antonio, Texas, USA) su un babbuino (*Papio cynocephalus*, fig. 3) di 4 mesi di età, che mostrava, all'esame necroscopico, segni di infezione acuta da *T. cruzi*, è stato svolto uno studio pilota utilizzando babbuini stabulati presso SFBR, la cui storia pregressa, il pedigree e la stabulazione erano note e monitorate. In condizioni igieniche ambientali fuori controllo, l'8% dei babbuini contraeva naturalmente il morbo di Chagas e alcuni mostravano, all'ECG e all'ecocardiogramma, le anomalie cardiache tipiche della patologia. Si è così accertato che la morbilità in questa specie dipende, in parte, da fattori genetici e che l'infezione da *T. cruzi* persiste e induce la produzione di anticorpi vita natural durante, proprio come accade nell'uomo.

Questa ricerca, finanziata da NIH, è proseguita con lo studio delle relazioni tra fattori ambientali (influenzano il rischio di infezione), genetici (condizionano l'infezione e la progressione della patologia), età, sesso e presenza di anticorpi nel sangue dei babbuini della colonia. L'ereditabilità della sieropositività nel babbuino è circa del 50%, come nell'uomo: in altre parole, la probabilità che un uomo, o un babbuino, siano contagiati da *T. cruzi* dipende tanto da fattori genetici quanto da fattori ambientali. L'identificazione di uno o più geni che determinano la sieroconversione [passaggio dalla sieronegatività (assenza di anticorpi nel siero) alla sieropositività (presenza di anticorpi nel siero)], in queste scimmie e nell'uomo, potrebbe avere una ricaduta determinante sugli studi di farmacogenomica per l'individuazione e la messa a punto di strategie terapeutiche/vaccinali per l'uomo (VandeBerg, 2002).

Nel 1984 è stata individuata una colonia di babbuini infettati naturalmente da *T. cruzi*. I principali risultati della necroscopia di quattro scimmie, che all'esame al microscopio presentavano amastigoti di *T. cruzi* nei cardiomiociti, insufficienza cardiaca congestizia, con edema delle zone dipendenti, idrotorace, idropericardio e miocardite linfo-plasmacitica multifocale-diffusa, confermano che il babbuino e l'uomo condividono la sintomatologia del morbo di Chagas e che il primo rappresenta un modello animale di patologia in un primate che può contribuire in modo significativo alla ricerca e allo sviluppo di nuove terapie per la cura della patologia nell'uomo (Williams, 2009).

Ricerca di terapie innovative del morbo di Chagas e risultati ottenuti in modelli animali: benznidazolo nel topo

Qualche anno fa, uno studio in un modello murino ha mostrato che, in seguito a cure farmacologiche, si sviluppa una memoria stabile, antigene-indipendente, in cellule T $CD8^+$ di topi infettati cronicamente da *T. cruzi*.

Grazie alla messa a punto di una chemioterapia efficace a base di benznidazolo (*N*-benzyl-2-nitroimidazole acetamide) contro l'infezione cronica da *T. cruzi*, è stato ampiamente documentato il primo caso di eliminazione totale di *T. cruzi* dopo un trattamento farmacologico di lunga durata (alcune centinaia di giorni), equivalente a un terapia della durata di vari anni nell'uomo. Il risultato della terapia è stato la comparsa di una popolazione stabile di cellule T $CD8^+$, parassita-specifiche, con le caratteristiche di *central memory T cell*[5], in base all'espressione di CD62L, CCR7, CD127, CD122, Bcl-2 e a una funzionalità diretta *in vivo* CTL (*cytotoxic T Lymphocyte*) ridotta. Le cellule T $CD8^+$, ottenute dai topi trattati, curati e guariti, si sono espanse più rapidamente e hanno esercitato una maggior protezione a seguito di un *challenge* rispetto alle stesse cellule ottenute dai topi di controllo infettati cronicamente, ma curati per un tempo più breve o non curati affatto, non completamente liberati da *T. cruzi*.

In conclusione, questi risultati mostrano che l'eliminazione totale di *T. cruzi* risulta nella formazione di una *T-cell memory* stabile, antigene-indipendente e protettiva, nonostante gli effetti potenzialmente debilitanti della precedente esposizione di lungo termine all'antigene, durante l'infezione cronica (Bustamante, 2008).

La dominanza del sottogruppo delle *central memory T cells*, che non aumentano di numero finchè l'organismo non è stato completamente liberato dall'infezione, è il risultato che fa di questo modello nel topo il *golden* standard dei modelli animali per lo studio del morbo di Chagas: la presenza di queste cellule immunitarie indica: 1) che *T. cruzi* è stato eliminato del tutto; 2) che l'infezione cronica sperimentale indotta da *T. cruzi* nel topo può essere curata; 3) che questo modello murino di infezione è ben caratterizzato e validato, tanto che 4) può essere usato nella valutazione di nuove molecole candidate; 5) che, fornendo risposte sul sistema immunitario del topo, permette di monitorare i risultati della cura, e che 6) la ricerca delle *memory T cells* specifiche per *T. cruzi*, nel sangue di pazienti chagasici in trattamento, dovrebbe permettere di diagnosticare con certezza se il parassita è stato eradicato completamente (Tarleton, 2009).

… ciclofosfamide nel cane

La somministrazione ripetuta di dosi basse, non immunosoppressive, di ciclofosfamide (CPA, 50 mg/sq.m., per via sottocutanea, 3 volte/settimana, per 3 settimane) ha esacerbato la miocardite cronica in giovani cani meticci (*Canis lupus familiaris*) infettati cronicamente per via intraperitoneale con tripomastigoti di *T. cruzi* del ceppo *Colombian*, ottenuti da topi *Swiss* infetti. In questi cani, la miocardite si presentava con diversa gravità, ma in alcuni casi era molto grave e diffusa, con necrosi focale fibrinoide coagulativa e litica e invasione delle fibre miocardiche, in corso di disfacimento, da parte di cellule infiammatorie mononucleate (macrofagi, linfociti, plasmacellule).

Al contrario, cani di controllo, ugualmente infettati, ma non trattati con CPA, mostravano solo una moderata miocardite focale, sotto forma di accumulo di linfociti nel tessuto connettivo interstiziale. La somministrazione di basse dosi di CPA potrebbe aver interferito con il network soppressore immunologico che si ritiene mantenga indeterminata (o latente) la fase cronica dell'infezione da *T. cruzi* (Andrade, 1987).

… dermaseptina DS 01 in vitro

Le secrezioni cutanee degli anfibi sono una fonte ricca di molecole biologicamente attive, come alcaloidi, ammine biogene e peptidi, tra i quali sono le dermaseptine, classe di peptidi cationici lineari dotati di attività antimicrobica, presenti nella cute delle rane del genere *Phyllomedusa*. Si tratta di molecole di 28-34 residui amminoacidici (aa), ricche di lisina, la cui struttura chimica è facilmente modificabile, che permeabilizzano la membrana di

Fig. 4. Epimastigote (a sinistra), stadio di sviluppo di *T. cruzi*. Si trova nell'intestino dell'insetto vettore (triatomina) e ha il chinetoplasto adiacente e anteriore al nucleo, mentre il flagello emerge al centro della cellula. Tripomastigote (a destra), simile a quelli che si ritrovano nei cani e negli animali domestici infettati da *T. cruzi* (da: dna.kdna.ucla.edu).

batteri Gram+ e Gram-, di lieviti e di funghi filamentosi, senza provocare emolisi. Nelle secrezioni cutanee di *Phyllomedusa oreades* (anfibio anuro arboreo, famiglia *Hylidae*, endemico della savana brasiliana) è stato identificato DS 01, peptide antimicrobico di 29 residui aa, del quale sono state determinate massa molecolare (2793,39 Da), struttura primaria, attività biologiche (a 3-25 μM è dotato di proprietà antibatteriche contro Gram+ e Gram-) e potenziali applicazioni terapeutiche. La sua attività citolitica antiprotozoaria è molto rapida ed è stata valutata su tripomastigoti ed epimastigoti[6] di *T. cruzi* (fig. 4) in colture cellulari e in terreni contenenti sangue. Entro 2 ore di incubazione con DS 01, ad una concentrazione finale pari a circa 6 μM, le cellule del protozoo non erano più rilevabili. Alla microscopia a forza atomica e alla citometria a flusso non è stato possibile rilevare alcun potenziale tossico di DS 01 a carico di eritrociti e leucociti di topo, in quanto non si sono osservate alterazioni morfologiche a concentrazioni litiche di questa dermaseptina, a conferma che DS 01 discrimina le cellule di mammifero da quelle microbiche, risultando tossico solo per queste ultime.

Questi risultati lasciano intravvedere applicazioni terapeutiche di DS 01 come agente anti-*T. cruzi*, in particolare per prevenire infezioni da trasfusioni di sangue infetto.

Due dermaseptine di sintesi, polipeptidi di 28 aa, la dermadistintina K (DD K) e la dermadistintina L (DD L), sono dotate di analoga attività contro *T. cruzi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *E.coli*. La *proton-decoupled 31P solid-state NMR spectroscopy* indica che DD K si distribuisce nel doppio strato lipidico, scompaginando la struttura delle membrane cellulari di *T. cruzi* a livello del gruppo di testa fosfolipidico (Brand, 2002).

… D0870 in modelli murini

Vari trattamenti sperimentali sono risultati efficaci e selettivi contro il tripanosoma, sia in vitro che in modelli animali. La ricerca di nuovi target farmacologici di questa tripanosomiasi si è intensificata, soprattutto dopo il sequenziamento del genoma di *T. cruzi* (nel 2004) che, si spera, fornirà spunti originali per strategie terapeutiche innovative.

Target patologici includono, per lo più ma non solo, inibitori selettivi di attività enzimatiche critiche del ciclo biologico di *T. cruzi*, che interferiscono con la sintesi di componenti vitali delle sue membrane, come gli inibitori della squalene sintetasi (trasforma 2 molecole di 2-farnesil-pirifosfato in una di squalene, triterpene precursore degli steroli), e dell'ossidosqualene ciclasi (catalizza la reazione 2,3-ossidosqualene a lanosterolo), o di cruzain (principale enzima autoproteolitico di *T. cruzi*).

Un lattone sesquiterpenico, estratto dall'*Artemisia douglasiana*, la deidroleucodina, che interferisce con la crescita degli epimastigoti di *T. cruzi*, rappresenta un altro filone della ricerca di una terapia del morbo di Chagas. Gli steroli presenti nelle membrane

di *T. cruzi* assomigliano, per composizione e *pathway* biosintetica, a quelli dei funghi.

L'efficacia di un derivato bis-triazolico antifungino, D0870, è stata valutata in modelli murini del morbo di Chagas di breve e di lunga durata. D0870 ha prevenuto la morte e curato la parassitologia nel 70-90% degli animali, in ambedue le forme della patologia.

Al contrario, farmaci di uso corrente, come nifurtimox e chetoconazolo, prolungano la sopravvivenza dell'ospite, ma non producono significativi effetti curativi. D0870 si presentava come promettente agente terapeutico per il trattamento della forma cronica del morbo di Chagas umano, tuttora incurabile (Urbina, 1996). Purtroppo, nonostante la sua efficacia e la buona tollerabilità, sia come agente anti-fungino che come farmaco anti-*T. cruzi*, lo sviluppo clinico di D0870 è stato bloccato quando, negli studi regolatori di *Safety Pharmacology* (ICH S7 e ICH S7A) si è osservato che, a concentrazioni plasmatiche >3 μg/mL, prolungava l'intervallo QT nell'ECG del cane beagle, indice di una ritardata ripolarizzazione delle cellule miocardiche che può degenerare in aritmie maligne, fibrillazione ventricolare e sincope. In realtà, D0870 ha provocato morte cardiaca improvvisa in tre cani, ma solo a concentrazioni plasmatiche comprese tra i 30 e i 70 μg/mL (Williams, 2001).

… derivati azolici (LP10, VNI, VNI/VNF) nel topo

Fungicidi azolici inibitori dell'ossidoreduttasi sterolo 14α-demetilasi (CYP51) curano con successo le infezioni fungine nell'uomo.

Sono in corso di valutazione tentativi per adattare posaconazolo e ravuconazolo, azoli antifungini inibitori della sintesi dell'ergosterolo[7], come agenti di seconda scelta nella terapia del morbo di Chagas. Il disegno razionale degli inibitori nonazolici di CYP51 dovrebbe permettere di superare le perplessità relative ai costi e alla resistenza (dovuta a mutazioni del gene cyp51 di *T. cruzi*) legate all'uso degli azoli nel morbo di Chagas.

Topi trattati con un inibitore nonazolico di CYP51, LP10 (40 mg/kg BID, orale, per 30 giorni, a partire da 24 ore dopo l'induzione dell'infezione) non hanno mostrato i sintomi della patologia acuta e, 6 mesi dopo, i loro tessuti apparivano assolutamente normali all'esame istologico. Al test molto più stringente della PCR, 4 topi su 5 sono risultati negativi per la presenza del DNA di *T. cruzi*. L'analisi della composizione sterolica delle membrane cellulari, alla microscopia elettronica e alla gas-cromatografia-spettrometria di massa, ha confermato che il trattamento con LP10 blocca lo step mediato dalla sterolo 14α-demetilasi, provocando la rottura delle membrane cellulari del tripanosoma e inducendo gravi alterazioni ultrastrutturali e morfologiche, che culminano nella morte dell'amastigote, la forma clinicamente più rilevante di *T. cruzi* (Doyle, 2010).

Un altro azolo-derivato, VNI, potente e selettivo inibitore della sterolo 14α-demetilasi di *T. cruzi*, somministrato oralmente (25 mg/kg per 30 giorni) a topi infettati con *T. cruzi* di ceppo *Tulahuen*, ha curato con successo sia la fase acuta sia quella cronica della patologia nel 100% dei topi, con una sopravvivenza del 100%, in assenza di effetti collaterali/tossici osservabili. VNI e il suo derivato VNI/VNF (25 mg/kg, BID) si sono mostrati potenti antiparassitari in un modello murino molto stringente, anche contro *T. cruzi* appartenente ai ceppi Y e Colombiana, resistenti ai nitroderivati. Sono stati eseguiti esami di microscopia elettronica a trasmissione e test di mutazione genica inversa per esplorare gli aspetti ultrastrutturali dell'attività di VNI e il suo potenziale mutageno. Il test di Ames non ha evidenziato attività mutagena (genotossicità) in questa molecola fino alla concentrazione 3,5 μM; i principali danni ultrastrutturali indotti da VNI nel tripanosoma riguardavano l'apparato di Golgi e il reticolo endoplasmico, con protrusioni delle membrane plasmatiche che presentavano un fenotipo autofagico. Se al favorevole profilo farmacodinamico/farmacocinetico/tossicologico di VNI,

e di VNI/VNF, si unisce il loro basso costo (<0,10 €/mg), aspetto importante data la povertà delle regioni nelle quali *T. cruzi* è endemico, è lecito sperare che nuove opportunità si apriranno per la terapia del morbo di Chagas, patologia grave e tuttora priva di terapie risolutive (Villalta, 2013; Soeiro, 2013).

… inibitori di cruzain nel topo

Cruzain (o cruzipain, gp 57/51), principale cisteina-proteasi di *T. cruzi*, oltre a essere uno degli antigeni immunodominanti in fase cronica della malattia di Chagas, è un enzima critico per la sopravvivenza e replicazione del tripanosoma nelle cellule dell'organismo parassitato, ed è un target validato di potenziali farmaci tripanocidi. La scoperta di nuovi inibitori di cruzain e la risoluzione delle loro interfacce molecolari che si legano a questo enzima fornirà, in prospettiva, una piattaforma per la scoperta di farmaci contro questo target di resistenza di *T. cruzi*. Il primo trattamento coronato da successo, a base di un inibitore di cruzain, in un modello animale di morbo di Chagas, è stato eseguito con pseudo-peptidi derivatizzati con fluorometil-chetone, che hanno protetto topi infettati letalmente da *T. cruzi*. Lo scaffold pseudo-peptidico ottimale è risultato essere fenilalanina-omofenilalanina che, per ottenere una cura efficace dell'infezione, è stato incorporato in un derivato vinil-solfone (gruppo funzionale solfonile: R-S(=O)(=O)-R') meno tossico. Anche N-metil piperazina-fenil-omofenil-vinil solfone è risultato efficace in topi infettati letalmente: 6 topi sono sopravvissuti oltre 9 mesi, 3 senza ulteriori trattamenti e 3, che erano entrati nello stadio cronico della patologia, sono stati sottoposti a un nuovo ciclo di trattatamento della durata di 20 giorni. Alla fine dell'esperimento, le emocolture di 5 topi su 6 sono risultate ripetutamente negative, dimostrando l'efficacia di questa terapia contro *T. cruzi*. Studi sul meccanismo di azione degli inibitori della forma amastigote (intracellulare) del tripanosoma indicano che il ciclo vitale di *T. cruzi* è stato interrotto, in questi topi, grazie all'arresto inibitorio del normale processo autoproteolitico di cruzain a livello del complesso di Golgi del tripanosoma. Parassiti ricuperati dai cuori di topi infettati con *T. cruzi* e curati con N-metil piperazina-fenilomofenil-vinil solfone, mostravano le stesse marcate alterazioni morfologiche prodotte da questo prodotto sul tripanosoma *in vitro*, mentre non si sono riscontrate alterazioni nei complessi di Golgi delle cellule infettate dell'ospite.

Questo studio rappresenta il *proof of concept* che dosi terapeutiche di inibitori di cruzain possono essere somministrate a animali con morbo di Chagas per arrestare l'infezione da *T. cruzi* (Engel, 1998).

Un altro inibitore di cruzain è stato ottenuto da un estratto salino di semi secchi di *Bauhinia bauhinioides*: si tratta di una proteina di 164 residui aa e massa di 18.034 Da, con Ki=0,3 nM. *T. cruzi*, e i parassiti del genere *Leishmania*, hanno un assoluto fabbisogno di specifici steroli endogeni (ergosterolo e analoghi) per sopravvivere e crescere, ma non riescono a sfruttare l'abbondante scorta di colesterolo presente nei mammiferi che parassitano. La squalene sintetasi (SQS) è una transferasi microsomiale che catalizza la trasformazione di due molecole di farnesil-pirofosfato in una di squalene, primo step della biosintesi degli steroli, nella pathway della biosintesi dell'isoprene. Il blocco di questa reazione non condiziona la sintesi di altri isoprenoidi essenziali. SQS è oggetto di intensa ricerca come possibile target di farmaci ipocolesterolemizzanti, ma non è stata ancora valutata a fondo come target di potenziale attività chemioterapica antiparassitaria. SQS è un enzima di membrana presente sia negli epimastigoti di *T. cruzi* che nei promastigoti di *L. mexicana*, con una duplice localizzazione subcellulare, essendo più o meno ugualmente distribuito tra i glicosomi (sede della glicolisi, della ß-ossidazione degli acidi grassi e di altri processi metabolici) e le vescicole mitocondriali/microsomiali. Studi di cinetica enzimatica hanno mostrato che gli enzimi di questi parassiti hanno una normale cinetica di Michaelis & Menten, e che i valori delle costanti cinetiche sono comparabili a quelli del corrispondente enzima dei mammiferi.

È stata sintetizzata e purificata una piccola molecola che inibisce in modo specifico la SQS di mammifero, il 3(bifenil-4yl)-3-idrossichinuclidina (BPQ-OH), che si è rivelato un potente inibitore non-competitivo anche della SQS di *T. cruzi* e *L. mexicana*, con Ki nel range 12-62 nM. BPQ-OH ha inibito, in modo concentrazione-dipendente, la proliferazione degli stadi extracellulari di questi parassiti, con minima concentrazione inibitoria della crescita (MCI) tra 10 e 30 μM, e ha eradicato gli amastigoti intracellulari di *T. cruzi* da colture di cellule Vero (cellule epiteliali renali di African green monkey) coltivate a 37°C, con MCI=30 μM, senza indurre effetti citotossici nel monostrato delle cellule ospiti (Urbina, 2002).

Un analogo di BPQ-OH, ER27856, altro inibitore specifico di SQS, ha inibito la moltiplicazione di *T. cruzi* con una IC_{50}=4,5 μM, mostrandosi 5 volte più potente di BPQ-OH (IC_{50}=24,3 μM) contro le forme epimastigoti. L'inibizione della crescita e la lisi dei tripanosomi, per opera di questi due prodotti, erano associate alla completa deplezione di squalene e steroli endogeni essenziali, causata dal blocco della SQS. Sia BPQ-OH che ER27856 hanno indotto profonde alterazioni morfologiche negli epimastigoti di *T. cruzi* in coltura, soprattutto a livello delle membrane cellulari depletate di componenti strutturali essenziali come gli steroli: 1) distacco delle membrane plasmatiche dal corpo cellulare; 2) distacco della membrana di rivestimento del corpo cellulare e del flagello, con 3) formazione di vescicole e bolle; 4) distacco del flagello, 5) allargamento della tasca flagellare e di un vacuolo localizzato nei pressi della stessa, 6) rigonfiamento dei mitocondri con invaginazioni della membrana mitocondriale interna, 7) alterazioni dei nuclei di alcune cellule, tipiche dell'apoptosi e 8) blocco della citocinesi, processo di divisione del citoplasma che normalmente segue la mitosi (Braga, 2004).

ER28448, ER119884, YM-53601, T21485, TAK-475, WC-9, E5700, ML092, DF461 e derivati delle 4,1-benzoxazepine sono solo alcune delle sigle che indicano piccole molecole di sintesi, oggetto di intenso studio *in vitro* e *in vivo* come potenziali inibitori della SQS. E' stata sintetizzata anche una grossa molecola, sc-49758, anticorpo policlonale contro SQS di topo, ratto e uomo.

In questi ultimi anni, gli studi di efficacia di questi inibitori della SQS sono stati finalizzati soprattutto alla valutazione del loro potenziale ipo-colesterolemizzante e anti-trigliceridemico, ma gli studi non clinici di farmacocinetica (ADME), di tollerabilità, di safety e di tossicità, eseguiti in roditori (topo, ratto, guinea-pig e hamster) e in scimmie marmoset (*Callithrix jacchus*) e rhesus (*Macaca mulatta*) con queste molecole, hanno valenza anche per la loro selezione basata sulla valutazione della loro efficacia, tossicità, tollerabilità e safety come inibitori della SQS di *T. cruzi*, in vista di un possibile sviluppo come agenti anti-tripanosomici selettivi.

Altre molecole che potrebbero entrare in ricerca e sviluppo clinico sono gli inibitori N-alchil-bifosfonati della farnesil-pirofosfato sintetasi e di nuovi target farmacologici che rappresentano approcci promettenti. Tra questi sono gli inibitori della tripanotione-disolfuro reduttasi (ossidoreduttasi, trasforma tripanotione in tripanotione-S-S), della ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi (converte l'ipoxantina in inosina monofosfato e la guanina in guanosina monofosfato) e originali inibitori della squalene sintetasi e dell'ossidosqualene ciclasi (isomerasi, converte 2,3-ossidosqualene in lanosterolo, precursore di tutti gli steroli). Questi prodotti sono in ricerca e sviluppo non-clinico e il loro ingresso nello sviluppo clinico è previsto solo nel medio-lungo termine (5-10 anni).

Speriamo di essere risusciti a dimostrare che numerosi modelli animali per lo studio in vivo di queste e di altre attività antitripanosomiche sono a disposizione della comunità scientifica che opera nel settore farmaceutico, e sono stati affinati e validati in oltre 30 anni di ricerche sul morbo di Chagas.

Note

Nota 1. L'ecocardiografia è una tecnica che si avvale dell'impiego degli ultrasuoni per visualizzare l'anatomia del cuore e la sua funzione. In particolare è in grado di fornire informazioni sulla sua contrattilità, sulla morfologia delle valvole cardiache e sul flusso del sangue all'interno delle cavità cardiache. L'ecocardiografia M-mode (monodimensionale) produce un'immagine delle strutture cardiache più simile a una figura tracciante che a un'immagine reale. La rappresentazione M-mode è molto efficace nel rappresentare un fenomeno dinamico. La traccia M-mode può essere generata in tempo reale, con processo indipendente e contemporaneo all'imaging bidimensionale, oppure generata dall'elaborazione delle immagini bidimensionali (M-mode ricostruito).

Nota 2. La xenodiagnosi è un metodo diagnostico per evidenziare la presenza di microrganismi, difficilmente individuabili nel sangue dei soggetti malati con le comuni tecniche di ricerca. Consiste nel provocare l'infestazione in ospiti intermedî: ad esempio, nutrendo triatomine sane allevate in laboratorio col sangue prelevato a un malato di tripanosomiasi di Chagas; nel contenuto intestinale di questi insetti è possibile, dopo circa trenta giorni, evidenzare i tripanosomi che si sono moltiplicati attivamente.

Nota 3. *Romaña's sign*, chiamato anche chagoma, rigonfiamento periorbitale unilaterale, non doloroso (foto 1), associato alla forma acuta del morbo di Chagas nel macaco e nell'uomo: si presenta come lesione cutanea rosso-violacea, foruncoloide, edematosa, ricca di tripanosomi in moltiplicazione attiva all'interno dei macrofagi.

Nota 4. Acalasia è la più comune patologia motoria primitiva dell'esofago. La malattia è caratterizzata dalla perdita progressiva della peristalsi esofagea e dalla incapacità di rilasciamento dello sfintere esofageo inferiore.

Nota 5. Le *central memory T cells* sono linfociti T che hanno precedentemente incontrato il/risposto al loro cognate antigen. Le *memory T cells* sono diventate *"experienced"*, avendo incontrato l'antigene durante una precedente infezione (o dopo una vaccinazione, ma non è questo il caso della triapanosomiasi chagasica, non essendoci vaccini contro questa patologia). Al secondo incontro con l'invasore, le *memory T cells* possono riprodursi per montare una risposta immune più veloce e forte di quella sviluppata al primo incontro con l'antigene, quando il sistema immunitario ha risposto per la prima volta all'"invasore".

Nota 6. L'epimastigote (foto 2) è la forma riproduttiva di *T. cruzi* nell'insetto vettore. Ha corpo allungato, flagello che emerge lateralmente con una piccola membrana ondulante, che parte accanto al cinetoplasto paranucleare. La forma dell'epimastigote (lungo 15-35 μm) viene assunta nell'ampolla rettale dell'insetto ematofago: qui avviene una riproduzione per divisione binaria e una parte degli epimastigoti, regolarmente, si trasforma in tripomastigoti metaciclici, forma molto più infettante di quelle del sangue. L'insetto rimane serbatoio per tutta la sua vita. Il ciclo nel vettore si compie in 2-4 settimane.

Nota 7. L'ergosterolo è un componente fondamentale della membrana cellulare dei miceti, dove svolge le stesse funzioni svolte dal colesterolo nelle membrane delle cellule animali. La fluidità delle membrane cellulari di alcuni protisti, come i tripanosomi, è assicurata dalla presenza dell'ergosterolo. I farmaci antimicotici agiscono legandosi all'ergosterolo o inibendone la sintesi.

Bibliografia

- Andrade, Z. A., Andrade, S. G., and Sadigursky, M., 1987; Enhancement of chronic Trypanosoma cruzi myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. Am J Pathol., 127: 467–473
- Barr, S. C., Simpson, R. M., Schmidt, S. P., Bunge, M. M., Authement, J. M., Lozano, F. C., 1989; Chronic dilatative myocarditis caused by Trypanosoma cruzi in two dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association, 195: pp.1237-1241
- Braga M. V., Urbina, J. A., Souza, W., 2004; Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Antimicrobial Agents. Vol 24: 72–78
- See comment in PubMed Commons belowBrand, G. D., Leite, J. R., Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, M. V., Azevedo, R. B., Carregaro, V., Silva, J. S., Sá, V. C., Brandão, R. A., Bloch, C. Jr., 2002; Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. J Biol Chem., vol. 277: pp. 49332-49340
- Bustamante, J. M., Bixby, L. M., & and Tarleton, L. R., 2008: Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective $CD8^+$ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nature Medicine, vol. 14*: pp. 542-550
- Doyle, P. S., Chen, C-K., Johnston, J. B., Hopkins, S. D., Leung, S. S. F., Jacobson, M. P., Engel, J. C., McKerrow, J. H., and Podust, L. M., 2010; A Nonazole CYP51 Inhibitor Cu-

res Chagas' Disease in a Mouse Model of Acute Infection. American Agents Chemother., vol 54: pp. 2480-2488
- Engel, J. C., Doyle, P. S., Hsieh, I., and McKerrow, J. H., 1998; Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Exp. Med.,* vol. 188: 725-734
- Lima, J. A., Szarfman, A., Lima, S. D., Adams, R. J., Russell, R.J, Cheever, A.,Trischmann, T., Weiss, J. L., 1986; Absence of left ventricular dysfunction during acute chagasic myocarditis in the rhesus monkey. Circulation., vol 73: pp. 172-179
- Montenegro, V. M., Jiménez, M., Pinto Dias, J. C., Zeledón, R., 2002; Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica., Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.97 no.4 Rio de Janeiro June vol. 97: pp. 491-494
- Soeiro, M. N., de Souza, E. M., da Silva, C. F., Batista, D. G., Batista, M. M., Pavão, B. P., Araújo, J. S., Aiub, C. A., da Silva, P. B., Lionel, J., Britto, C., Kim, K., Sulikowski, G,. Hargrove, T. Y., Waterman, M. R., and Lepesheva, G. I., (2013); *In Vitro* and *In Vivo* Studies of the Antiparasitic Activity of Sterol 14α-Demethylase (CYP51) Inhibitor VNI against Drug-Resistant Strains of Trypanosoma cruzi. Antimicrob. Agents Chemother.**,** vol. 57: 4151-4163
- Tarleton, L. R,. (2009) in: A New Gold Standard: Improved Animal Model Could Speed Drugs for Chagas' Disease (interview). National Institute to Understand, Treat, and Prevent Infectious, Immunologic and Allergic Diseases (NIH-NIAD)
- Urbina, J. A., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazardi, K., Piras, M. M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., Ryley, J. F., 1996; Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. Science, vol. 273: pp. 969-971
- *Urbina, J. A., Concepcion, J. L., Rangel S., Visbal, G., Lira, R., 2002; Squalene synthase as a chemotherapeutic target in Trypanosoma cruzi and Leishmania mexicana*. Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 125: pp. 35-45
- VandeBerg, J., and Williams, J., 2002; The baboon model of Chagas Disease. The Round-Up, The Southwest Regional Primate Research Center, Vol. 1, n° 1
- Villalta, F., Dobish, M. C., Nde, P. N., Kleshchenko, Y. Y., Hargrove, T. Y., Johnson, C. A., Waterman, M. R., Johnston, J. N., and Lepesheva, G. I., 2013; VNI Cures Acute and Chronic Experimental Chagas Disease. J Infect Dis., vol. 209: pp. 504-511
- Williams, K. J., and Denning, D. W., 2001; Termination of development of D0870. J. Antimicrob. Chemother. 47: pp. 720-721
- Williams, J. T., Dick E. J. Jr, VandeBerg, J. L., and Hubbard, G. B., 2009; Natural Chagas disease in four baboons. Journal of Medical Primatology, vol. 38: pp. 107-113

RODITORI, PULCINI E CONIGLI, MODELLI ANIMALI PER LO STUDIO DEL MORBO DI CHAGAS DELL'UOMO

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Eziologia, trasmissione, diagnosi ed epidemiologia del morbo di Chagas

Il morbo di Chagas (tripanosomiasi americana) è una parassitosi tropicale causata da *Trypanosoma cruzi* (genere: *Trypanosoma*, famiglia: *Trypanosomatidae*), protozoo cinetoplastide emoflagellato. Serbatoi naturali del parassita sono gli individui infetti: uomo, animali domestici e selvatici. Vettori, tramite le deiezioni depositate presso la puntura cutanea, praticata nottetempo per succhiare il sangue, sono cimici ematofaghe di generi diversi, tra i quali prevalgono le *Triatominae*, sottofamiglia delle *Reduviidae*, note come *triatomine bugs*, *conenose bugs*, chiamate anche *vinchucas* in Argentina, Bolivia, Cile, Uruguay e Paraguay, *barbeiros* in Brasile, *pitos* in Colombia, *chinches* in Centro America, *chipos* in Venezuela e *kissing bugs* o *assassin bugs* negli Stati Uniti (Maudlin, 2004). *T. cruzi* entra nell'ospite attraverso le mucose orale e nasale, la congiuntiva e lo strofinamento della cute contaminata dalle feci dell'insetto vettore.

Le triatomine (*Triatoma sanguisuga* è una delle più diffuse, fig. 1) si annidano nelle spazzole, nei soffitti di paglia o di legno, nei materassi, nelle crepe dei muri costruiti con mattoni di fango, nelle fessurazioni dei pavimenti.

Questa zoonosi, descritta dal grande malariologo *mineiro* Carlos Chagas nel 1909, è una sindrome clinica caratterizzata da una forma acuta e da una cronica, con sintomatologia evolutiva durante l'infezione. Nella fase acuta, che dura da qualche settimana a pochi mesi, la sintomatologia è assente o modesta: febbre, linfoadenopatia, cefalea, gonfiore locale nel sito della puntura; la diagnosi si basa sull'identificazione, al microscopio, di *T. cruzi* nel sangue (Rassi, 2012). In questa fase sono molto rari i casi acuti letali di miocardite e meningoencefalite. Dopo 8-12 settimane, la patologia entra nella fase cronica, che può durare anni ed è diagnosticabile dalla presenza di anticorpi contro *T. cruzi*: nel 60-70% dei casi è asintomatica (fase indeterminata) o produce sintomi moderati (febbre, affaticamento, dolori diffusi, cefalea, inappetenza, diarrea, vomito) che, nel 90% degli individui, si risolvono spontaneamente. Il restante 30-40% delle persone infettate può manifestare, anche a decenni di distanza dall'infezione, una sintomatologia più severa: compromissione del microcircolo cardiaco (aree focali di restringimento vascolare, microaneurismi, dilatazione e proliferazione di microvasi) indotta da una miocardite infettiva acuta, caratterizzata da tachicardia, ECG con intervallo PR prolungato, complessi QRS di basso voltaggio e alterazioni aspecifiche dell'onda T, car-

Fig. 1. *Triatoma sanguisuga* (*Conenose bug*) (Copyright © 2011 Shelly Cox)

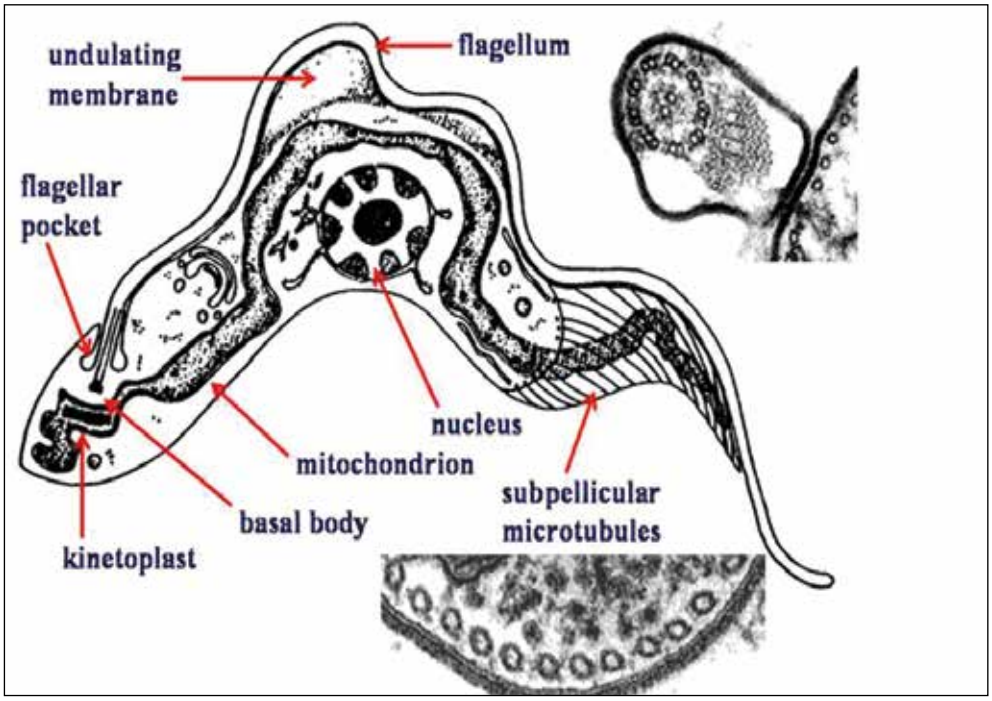


Fig. 2. Tripomastigote di *T. cruzi* (da: http://images.google.com/imgres?imgurl=www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/images/tc_lc_lg.gif&imgrefurl=)

diomegalia, il cui aspetto saliente è l'ingrossamento dei ventricoli; nel 20-30% dei casi sfocia nell'insufficienza cardiaca (Rassi, 2009; DPDx, 2010; Chagas disease, 2014). Si riscontrano anche anemia ed epato-splenomegalia. Il 10% dei casi sviluppa alterazioni a carico del sistema nervoso (demenza, encefalopatia, deficit sensoriali e motori) e dell'apparato digerente (Rassi, 2012). L'acalasia secondaria può essere il sintomo iniziale di disturbi digestivi, che si manifestano come megaesofago e megacolon, causati da miosite e ganglioneurite (Chagas disease, 2014).

L'ipotesi suggestiva di un legame patogenico sequenziale tra la fase acuta e quella cronica del morbo di Chagas, intervallate da una fase indeterminata, è stata a lungo messa in discussione e tuttora necessita di approfondimenti. Oltre alle feci dei *kissing bugs* contaminate dal tripanosoma, altre possibili vie di diffusione di *T. cruzi* sono le trasfusioni di sangue infetto, i trapianti di organi da donatori chagasici asintomatici, il passaggio placentare dalla madre al feto e il cibo contaminato dalle deiezioni della triatomina vettrice.

T. cruzi resiste a lungo al di fuori dei suoi ospiti abituali: sopravvive per 18 giorni a 4°C e per 250 giorni a temperatura ambiente. A tutto il 2013, non risultavano disponibili vaccini contro il morbo di Chagas; vaccinazioni con il *T. rangeli*, non patogeno, che condivide antigeni con *T. cruzi*, sono efficaci negli animali, mentre potenziali vaccini a DNA, per immunoterapia delle fasi acuta e cronica, sono oggetto di ricerca/valutazione presso vari gruppi (Maudlin, 2004).

La terapia farmacologica a base di benznidazolo (5-10 mg/kg/die per 30-60 giorni), som-

ministrato negli stadi acuti iniziali, ritarda l'insorgenza della cardiomiopatia nella fase cronica; altri farmaci di uso comune sono chetoconazolo e nifurtimox (8-10 mg/kg/3 volte al dì per 90 giorni) (Chagas disease, 2014) ma, in ogni caso, si tratta di farmaci che inducono effetti collaterali e resistenza. Tuttavia la rimozione del parassita dal circolo sanguigno può non influire sul corso clinico della patologia cronica. In mancanza di farmaci risolutivi per la cura dei soggetti infettati da *T. cruzi*, la prevenzione consiste nell'igiene personale e ambientale, nello screening del sangue da trasfusione e dei suoi derivati per uso umano, e nell'eradicazione delle triatomine con spray e pitture insetticide a base di piretroidi.

La FDA ha approvato due test diagnostici e ha pubblicato linee guida sullo screening di sangue e derivati per donazioni.

I malati di morbo di Chagas, stimati in 16-18 milioni, vivono prevalentemente in Messico e in Centro-Sud America; le persone a rischio di infezione sono oltre 100 milioni. Negli anni 1990, 2006 e 2010, sono stati registrati, rispettivamente, 9300, 12.500 e 10.300 decessi, ma si stima che le morti siano, in realtà, 45-50.000/anno, nel 60% dei casi causate da un'aritmia fatale (fibrillazione ventricolare). I nuovi malati sono circa 45.000/anno e 14.400 neonati/anno contraggono il morbo di Chagas congenito attraverso la placenta, o dal latte materno infetto.

Massicce migrazioni dal Centro-Sud America coinvolgono, nell'epidemiologia, il sud degli Stati Uniti (100-300.000 i malati stimati) e l'Europa (4000 casi diagnosticati tra il 1999 e il 2009: 3617 (42.000 stimati) in Spagna, 180 in Svizzera e 144 in Italia (stimati 4-5000), regioni non endemiche nelle quali questa patologia si sta manifestando come problema sanitario emergente (Chagas disease, 2014).

Opossum, armadilli, procioni, scoiattoli, ratti e topi sono i principali serbatoi naturali di *T. cruzi* negli USA, dove i vettori principali sono *Triatoma sanguisuga* e *T. protracta*.

Probabilmente, Charles Darwin (1809-1882) contrasse, nel marzo del 1835 nei pressi di Mendoza (Argentina), il morbo di Chagas, quando fu punto dal cosiddetto *great black bug of the Pampas*, come racconta nel suo diario di viaggio: *"At night I experienced an attack (for it deserves no less a name) of the Benchuca (a species of Reduvius) the great black bug of the Pampas. It is most disgusting to feel soft wingless insects, about an inch long, crawling over ones body. Before suckling they are quite thin, but afterwards they become round and bloated with blood, and in this state are easily crushed"* (Charles Darwin's Voyage of the "Beagle", Chapter 15, 1839). Dopo un mese di indisposizione trascorso a Valparaiso (fase acuta), Darwin tornò in Inghilterra, ma dal 1837 incominciò a soffrire di attacchi intermittenti, caratterizzati da una strana sintomatologia (fase cronica), della quale non seppe mai darsi ragione, che lo rese invalido per il resto della vita.

Solo 70 anni dopo, Carlos Chagas (1879-1934) individuò, in *T. cruzi* veicolato da una triatomina (il *great black bug* of the Pampas), l'agente patogeno del morbo che da lui prese il nome. Tentativi di verificare se Darwin contrasse davvero il morbo, poi detto di Chagas, sottoponendo all'esame della PCR campioni dei suoi resti mortali, che riposano nell'Abbazia di Westminster a Londra, si sono scontrati col rifiuto del priore dell'Abbazia di concedere il permesso alla riesumazione.

Meccanismi di persistenza di *T. cruzi*, immunità adattativa e morbo di Chagas cronico

La "persistenza" di *T. cruzi* nell'ospite umano o animale è la forza trainante che perpetua la forma cronica del morbo di Chagas, sempre associata all'infezione persistente del tripanosoma.

Recentemente, studi *in vitro* e in modelli animali di questa patologia, hanno permesso di aggiornare le conoscenze su strategie e meccanismi adottati dal parassita per entrare nelle cellule dell'ospite e stabilire un'infezione persistente, malgrado la potente risposta immuni-

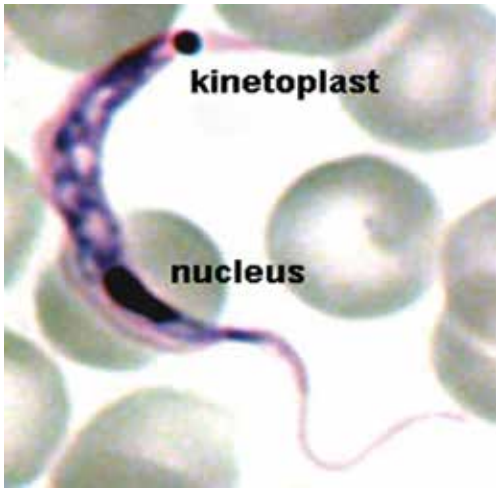


Fig. 3. Tripomastigote di *T. cruzi* (da: http://images.google.com/imgres?imgurl=www.tulane.edu/wiser/protozoology/notes/images/tc_lc_lg.gif&imgrefurl)

taria attivata da quest'ultimo. Per invadere e parassitare un ospite, *T. cruzi* interagisce, con molte delle sue molecole, con i recettori cellulari dell'ospite stesso e ricorre a diverse strategie per mantenere con questo un rapporto parassitario, assicurandosi consistenti rifornimenti di nutrienti per la propria sopravvivenza e persistenza di lungo periodo nell'organismo parassitato.

T. cruzi ha sviluppato vari meccanismi per eludere il sistema immunitario dell'ospite. Tra i principali, c'è la soppressione del *phagocyte oxidative burst* che consiste nell'espressione, da parte di *T. cruzi*, di un sistema antiossidante e di tromboxano A2 (TXA2) per sfuggire all'assalto fagosomiale ossidativo messo in atto dall'organismo parassitato per neutralizzarne la capacità di eliminare il tripanosoma. Macrofagi residenti nel tessuto naïve dell'ospite, o attivati a seguito dell'ingestione del parassita, attivano la NADPH ossidasi e la NO-sintetasi inducibile che producono, rispettivamente, superossido ($O_2^{\bullet-}$) e NO fagosomiali; questi promuovono la formazione di perossinitrito ($ONOO^-$), potente agente ossidante e nitrosante che uccide direttamente *T. cruzi* nei macrofagi. Queste *reactive oxygen species* (ROS) sono regolatrici critiche della proliferazione delle cellule infiammatorie spleniche e delle risposte delle citochine dell'ospite durante l'infezione di *T. cruzi*, e giocano quindi un ruolo importante nella formazione di un'immunità adattativa per il controllo del parassita.

T. cruzi usa un elegante sistema antiossidante per fronteggiare l'assalto ossidativo, assicurando il proprio rilascio dal fagosoma (vacuolo intra-citoplasmatico che si forma quando una cellula eucariota ingloba materiale estraneo, in questo caso il tripanosoma) nel citoplasma delle cellule parassitate.: in breve, *T. cruzi* rilascia equivalenti riducenti da NADPH a una varietà di sistemi enzimatici detossificanti che utilizzano gli antiossidanti tripanotione[3] ($T(SH_2)$), forma insolita di glutatione, contenente due molecole di glutatione unite da un linker di spermidina (poliammina), glutatione, acido ascorbico e triparedoxina[4].

Studi del proteoma di *T. cruzi* suggeriscono che, negli stadi metaciclici e nel sangue, tripomastigoti[1] (figg. 2,3) e amastigoti[2] (fig. 4) abbiano sovraregolate la superossido-dismutasi mitocondriale Fe-dipendente (detossifica $O_2^{\bullet-}$), la tripanotione sintetasi, la triparedoxina e membri della famiglia delle triparedoxina perossidasi (neutralizzano $ONOO^-$ e H_2O_2). Questi enzimi, in particolare tripanotione sintetasi e triparedoxina perossidasi, sono importanti per la sopravvivenza, la replicazione e il differenziamento di *T. cruzi* (Nagajyothi, 2002).

In conclusione, questi risultati dimostrano che *T. cruzi* utilizza il suo sistema antiossidante per un viaggio di successo dall'invasione dei macrofagi all'inizio dell'infezione, in modo da assicurare la sua diffusione ai tessuti e organi lontani. Oltre a sopravvivere all'assalto ossidativo acuto dei macrofagi, l'espressione di antiossidanti in vari ceppi di *T. cruzi* può essere anche legata alla sua capacità di instaurare un'infezione cronica in altre cellule e tessuti dell'ospite.

Un secondo meccanismo di persistenza è basato su TXA2. Si pensava che le piastrine attivate dell'ospite fossero la principale fonte di TXA2 ed esplicassero un'attività diretta anti-

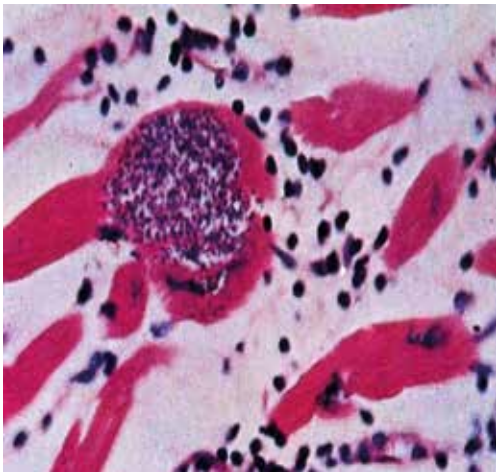


Fig. 4. Amastigoti di *T. cruzi* (da: http://www.pasteur.fr/recherche/unites/tcruzi/minoprio/tropical/chagas/chapter3.html)

T. cruzi. Recentemente, si è scoperto invece che gran parte del TXA2 vasoattivo e pro-infiammatorio presente nel plasma di topi infettati da *T. cruzi* deriva, in realtà, dal tripanosoma parassita e non dalle piastrine del topo ospite. Il rilascio di TXA2 nella corrente sanguigna aiuta il topo infettato acutamente a sopravvivere, e facilita la transizione della patologia dalla fase acuta alla fase cronica: infatti, la prevenzione della risposta dell'ospite al TXA2 prodotto dal parassita, aumenta parassitemia e mortalità dei topi malati. TXA2 regola vasospamo, trombosi, permeabilità vascolare e disfunzioni delle cellule degli endoteli vasali durante la fase acuta della patologia ed esplica attività immunosoppressive nei topi *wild-type*, nei quali la patologia è minimale, mentre nei topi knockout - nei quali è soppressa l'espressione del gene che codifica per il recettore di TXA2 - si assiste a un aggravamento sia della miocardite che del parassitismo nei tessuti. Il segnale TXA2 da parte dell'ospite parassitato potrebbe agire come *quorum-sensing mechanism* (sistema di regolazione trascrizionale, meccanismo usato dalle cellule del parassita per comunicare tra di loro) per *T. cruzi* che regola la proliferazione degli amastigoti intracellulari durante l'infezione acuta, prevenendo così la morte dell'ospite in questa fase e favorendo la transizione a uno stato di infezione cronica persistente (Nagajyothi, 2002).

Il terzo meccanismo di persistenza di *T. cruzi* nell'ospite consiste nella sua capacità di stabilire un'infezione cronica in altre cellule e tessuti. Studi in cardiomiociti in *vitro* e *in vivo* in animali infettati dimostrano che l'esposizione a *T. cruzi* altera il potenziale di transizione dei pori della membrana mitocondriale e il gradiente di elettroni attraverso la catena respiratoria, che comporta la perdita di elettroni che sono conferiti a O_2, con aumentata formazione di $O_2^{\bullet-}$ nei cardiomiociti e nei cuori degli animali infettati. Questi ROS possono promuovere la soppressione diretta del parassita, mentre il rilascio mitocondriale di ROS e di altre molecole, come il citocromo C, sono stimoli che attivano la *pathway* che porta all'apoptosi per la rimozione delle cellule danneggiate. Verosimilmente, isolati di *T. cruzi* che esprimono più alti livelli di antiossidanti hanno la capacità di eliminare i ROS intracellulari (mitocondriali) e di prevenire la morte cellulare e la normale eliminazione omeostatica delle cellule invase, attraverso le vie che portano all'apoptosi, assicurando così il supporto di nutrienti per la propria sopravvivenza di lungo termine nell'ospite (Nagajyothi, 2002).

Una quarta strategia messa in atto da questo parassita per stabilire uno stato di persistenza nell'ospite è stata scoperta e descritta in dettaglio negli anni '70 del secolo scorso, ma solo 25 anni dopo se ne è chiarito il significato e l'importanza funzionale: si tratta del parassitismo degli adipociti e del tessuto adiposo da parte di *T. cruzi*. Già 15 giorni dopo l'infezione (g.d.i.) da *T. cruzi ceppo Brazil*, nel topo si registra una carica del parassita sia negli adipociti bruni che in quelli bianchi, significativa se confrontata ad altri organi quali cuore e milza, con riduzione della massa grassa e del contenuto in grassi. Trenta g.d.i., prevale una significativa infiammazione sistemica, mentre marker della fase acuta, come la glicoproteina aci-

da a-1 e SAA3 (*Serum Amyloid A*) sono sovraregolati nel tessuto adiposo di questi topi, che presenta anche un'elevata espressione di citochine pro-infiammatorie (TNF-a, IL-1ß, IFN-γ), di chemochine e di recettori toll-like, chiamati anche PRR (*Pattern Recognition Receptors*) perché riconoscono e si legano a determinati profili molecolari e strutture tipiche di patogeni e microbi, e sono implicati nella difesa dell'organismo, in particolare nell'immunità innata.

Durante la fase cronica dell'infezione murina, il tessuto adiposo, che mostra persistenza sia di macrofagi che di parassiti, sarebbe un sensore precoce e un target dell'infezione di *T. cruzi*, e rappresenterebbe un serbatoio cronico dal quale l'infezione può avere una recrudescenza in occasione di stati immunosoppressivi indotti da farmaci o da stati fisiologici, come anche in presenza di lipoatrofia associata a HIV/AIDS.

Secondo alcuni autori, il parassitismo cronico/persistente da parte di *T. cruzi* nel tessuto adiposo potrebbe creare uno stato infiammatorio cronico di bassa intensità, simile a quello che si può osservare nell'obesità patologica. L'osservazione che un aumento degli acidi grassi nel tessuto adiposo, indotto localmente da una lipolisi, porta a un'intensificazione dell'infiltrazione di macrofagi, fornisce una possibile spiegazione degli effetti di lungo termine in alcuni cuscinetti adiposi a seguito di un'infezione acuta da *T. cruzi* e può portare a insulino-resistenza. Persistenza di *T. cruzi* oltre i 300 g.d.i è stata rilevata nel tessuto adiposo di topi infettati e confermata in quello di pazienti cronici affetti dal morbo di Chagas (Nagajyothi, 2002).

Modelli animali per lo studio della cardiomiopatia da morbo di Chagas in roditori, pulcini e conigli

Modelli animali del morbo di Chagas, messi a punto nel topo (Postan, 1986; Andrade, 1987; Morris, 1988; Guarner, 2001), nel cincilla (Bafort, 1973), nel pulcino di pollo (Teixeira, 2011), nel coniglio (Figueiredo, 1986; Teixeira, 1986), nel cane e nella scimmia, riproducono molti, ma non tutti in una stessa specie, i sintomi acuti e cronici della patologia umana.

Fattori legati alla specie ospite, al ceppo di *T. cruzi*, alla via di inoculo e al numero di microrganismi inoculati, condizionano la progressione della patologia dalla fase acuta a quella cronica e la sopravvivenza. I modelli animali del morbo di Chagas condividono molte analogie con la patologia miocardica umana e sono utili perché permettono di riprodurre e studiare gli aspetti dell'eziologia e della patofisiologia della cardiomiopatia chagasica.

…nel topo

All'esame dell'istopatologia cardiaca in topi (*Mus musculus*) C3H/He (MTV-), infettati da 2 a 440 giorni, con *T. cruzi clone Sylvio-X10/4*, è stata riscontrata un'infiammazione cardiaca persistente in molti soggetti, già 14 g.d.i. La fibrosi del miocardio, comparsa 45 g.d.i., e aggravatasi 200 g.d.i., si è sviluppata quando ormai erano presenti solo pochi parassiti. La fibrosi predominava nel sub-epicardio e nel sub-endocardio, aree con infiammazione più severa; parassiti, confinati nelle fibre miocardiche, sono stati trovati in tutti i topi infettati da 14-30 giorni e, in minor numero, nel 54% dei topi infettati da più di 30 giorni.

La miocardite indotta da *T. cruzi* non è una patologia autorisolventesi, ma un processo dinamico, attivo e continuo per un lungo periodo dopo l'infezione. Questo clone di *T. cruzi* induce, in topi consanguinei, una miocardite simile a quella riscontrata nei pazienti con morbo di Chagas cronico (Postan, 1986). Miocardite focale cronica e diffusa, con fibrosi interstiziale, si è sviluppata in topi Swiss, non consanguinei, e in ceppi di topi AKR e A/J consanguinei, infettati cronicamente con vari ceppi di *T. cruzi* di diversi tipi biologici (I, II e III, secondo la classificazione WHO (1986), con differenze per comportamento biologico e fenotipo (analisi degli isoenzimi). Principali sintomi erano: frequenti alterazioni dell'ECG, predominanza di

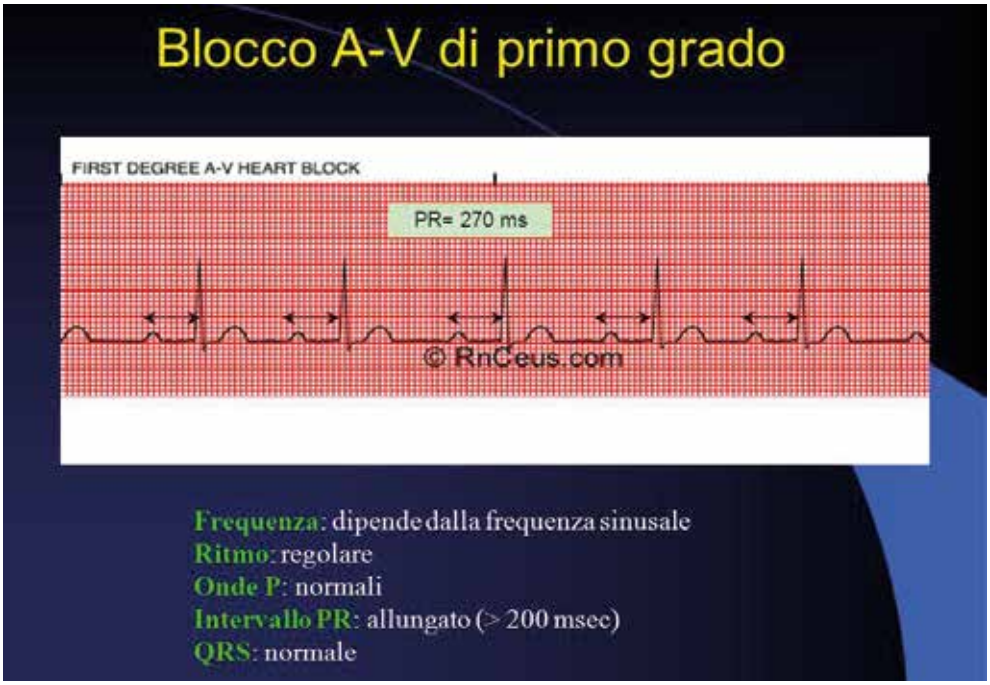


Fig. 5. Blocco atrio-ventricolare di I grado (da: slideplayer.it)

disturbi della conduzione intraventricolare, blocco atrioventricolare (AV) di I° (fig. 5) e di II° grado[5], e aritmie paragonabili a quelle riscontrate nel paziente chagasico. L'esame morfologico del tessuto di conduzione cardiaco (fig. 6) rilevava alterazioni infiammatorie e fibrotiche. L'infiammazione nel setto interatriale coincideva, quasi sempre, con il coinvolgimento infiammatorio del sistema di conduzione AV: infiammazione focale associata a vacuolizzazione e necrosi focale delle fibre specifiche. La maggior parte delle lesioni erano a carico del fascio di His[6] (76,3% dei casi), il 73,3% a carico della branca destra del fascio, il 43,9% interessavano il nodo atrioventricolare[7] e il 37,5% la branca sinistra. Nel 53,0-62,5% dei casi è stata riscontrata una correlazione significativa tra le alterazioni morfologiche nel tessuto di conduzione e le alterazioni ECG (Andrade, 1987).

Gli effetti dell'infezione del miocardio da *T. cruzi* sul complesso recettore ß-adrenergico-adenilatociclasi sono stati studiati nelle membrane cellulari del miocardio di topo. Sono stati determinati, per vari agenti ß-adrenergici, la velocità massima (Vmax) di generazione di cAMP e la concentrazione di agonista corrispondente al 50% della massima attività (Kact). Sei g.d.i., solo la Vmax per l'isoproterenolo declinava significativamente, non così la Kact apparente, che risultava ridotta solo 21 g.d.i. A 6 e 21 g.d.i, l'affinità dei ß-recettori per ^{125}Iiodocianopindololo era scesa da 0,84 a 3,6 e 3,0 nM, rispettivamente, mentre la densità recettoriale aumentava, con la durata dell'infezione, da 33 a 57 e 82 fmol/mg di proteine. La Vmax, ma non la Kact apparente, per forscolina e attività associate a Mg^{2+} e Mn^{2+}, scendeva 21 g.d.i. Un'altra attività adenilatociclasica, stimolata da Gpp(NH)p (guanilimidodifosfato, analogo non idrolizzabile di GTP), declinava in rapporto alla durata dell'infezione. Anche l'inibizione

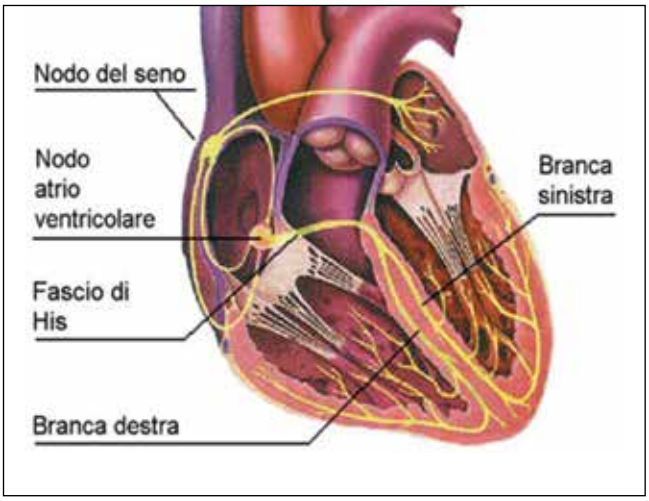


Fig. 6. Sistema di conduzione cardiaco (da: cardiopeople.com)

dell'adenilatociclasi da parte di adenosina e di Gpp(NH)p, in presenza di forscolina, scendeva 21 g.d.i. Questi risultati suggeriscono che le proteine accoppianti, Ns e Ni, che mediano, rispettivamente, il controllo stimolatorio e inibitorio dei recettori all'attività dell'adenilatociclasi, potrebbero essere danneggiate dall'infezione. Come monitorato dalle attività ADP-ribosilanti dei loro rispettivi substrati, proteine Ns e Ni incluse, dipendenti, rispettivamente, dalle tossine colerica e della pertosse, la disponibilità di Ns e Ni risultava diminuita dall'infezione da *T. cruzi*. L'aggiunta di NADP alle membrane infettate accresceva l'attività ADP-ribosilante dipendente dalla subunità-A1 della tossina colerica (si lega a una proteina G, che ne amplifica l'attività catalitica ADP-ribosilante, stimolando l'adenilatociclasi e aumentando cAMP) e ha reso l'attività ADP-ribosilante della proteina-Gi inibitoria dell'adenilatociclasi, dipendente dalla subunità-A della tossina della pertosse, uguale a quella osservata nelle membrane non infettate (la ADP-ribosilazione blocca la Gi inibitoria dell'adenilatociclasi e ciò comporta un aumento dell'attività dell'enzima e della quantità di cAMP).

Questi risultati rafforzano l'ipotesi che l'infezione da *T. cruzi* induca alterazioni profonde e generalizzate del complesso adenilatociclasi-proteina-G in vari siti differenti (Postan, 1986).

T. cruzi passa attraverso diversi stadi di sviluppo durante le fasi del suo ciclo vitale nei mammiferi. Sezioni istologiche di cuori infettati mostrano amastigoti intracellulari e, all'immunoistochimica (IHC), antigeni del parassita; tuttavia la presenza di tripomastigoti in questi tessuti si è dimostrata elusiva. In un ceppo di topi che sviluppa una cardiomiopatia chagasica 70 g.d.i. con *T. cruzi ceppo-Brasil*, istologicamente simile alla patologia nell'uomo, sono state studiate la distribuzione del parassita, nei suoi diversi stadi di sviluppo, e la gravità dell'infiammazione. Tutti gli organi presentavano un'infiammazione mononucleare di intensità variabile entro il 10° giorno, con picco tra il 20° e il 30° giorno, e decrescita entro il 50° giorno. Amastigoti sono stati rinvenuti entro il 10° giorno in miociti, istiociti, cellule acinose pancreatiche, astrociti e cellule ependimali, e la presenza di amastigoti raggiungeva valori di picco entro il 30° giorno. L'IHC ha mostrato la presenza di tripomastigoti flagellati in sinusoidi sanguigni, vasi e tessuti interstiziali di parecchi organi tra il 15° e il 50° giorno. Abbondanti antigeni del parassita sono stati rilevati nei tessuti connettivi durante tutto il periodo dell'infezione. Il carico di amastigoti e tripomastigoti durante la fase acuta sembra correlarsi

alla gravità dell'infiammazione nella fase cronica e ambedue ricalcavano le corrispondenti fasi del morbo di Chagas umano (Guarner, 2001).

…nel cincilla

Durante una ricerca sulla virulenza dell'infezione in diverse specie di roditori, indotta da tripanosomi prelevati dal primate platirrino *Aotus trivirgatus,* il cincilla (*Chinchilla lanigera*) ha mostrato particolare suscettibilità a *T. cruzi Aotus strain*.

L'inoculo di sangue ottenuto da una *owl monkey* (*New World Monkey, Aotidae*), con infezione da *T. cruzi* sub-manifesta e asintomatica, in topi gif/TB, ratti Wistar (*Rattus norvegicus*) e cincilla ha mostrato che la suscettibilità di quest'ultimo, almeno per questo particolare ceppo di tripanosoma, è considerevolmente maggiore di quella delle altre specie sottoposte a test.

Nel cincilla, la parassitemia, in continua crescita fino al picco, era molto grave e l'infezione si è rivelata sempre fatale. All'esame istologico, si sono evidenziate, nel cuore e in minor misura in altri organi (muscoli, parete intestinale), numerose pseudocisti con amastigoti. Ratti e topi, inoculati contemporaneamente al cincilla, non presentavano tripanosomi nel sangue periferico.

Ulteriori studi comparativi, usando lo stesso inoculo, hanno mostrato che l'infezione è fulminante e con esito letale solo nel cincilla. Inoltre, trials con topi, ratti, conigli e guinea-pig (*Cavia porcellus*), inoculati con sangue di cincilla che avevano sviluppato una forte parassitemia, confermavano l'osservazione precedente.

Anche *guinea-pig* ha mostrato una forte parassitemia e la sua suscettibilità a *T. cruzi* è sembrata maggiore di quella di topi, ratti e conigli, ma non di quella del cincilla, suggerendo che questo roditore possa essere un serbatoio naturale del tripanosoma, oltre che un eccellente modello sperimentale per lo studio del morbo di Chagas, non solo per l'elevata suscettibilità all'infezione, inducibile con numeri esigui di forme di *T. cruzi* sia ematiche o da insetto, sia da colture *in vitro*, ma anche perché mostra un gran numero di tripomastigoti nel sangue e amastigoti negli organi (Bafort, 1973). L'infezione acuta da *T. cruzi* può essere asintomatica, ma circa 1/3 dei casi infettati cronicamente può manifestare il morbo di Chagas.

Come abbiamo visto, la "persistenza" di *T. cruzi* e l'autoimmunità dell'ospite sono teorie che tentano di spiegare le manifestazioni cliniche e patologiche di questa parassitosi nel cuore e nel sistema gastrointestinale.

…nel pulcino

Per chiarire i rispettivi ruoli giocati dalla "persistenza" del parassita e dall'autoimmunità, è stato usato un modello animale, il pulcino di pollo (*Gallus gallus domesticus*), refrattario a *T. cruzi*.

Il tripanosoma è stato inoculato nella camera d'aria di uova embrionate di pollo. Alla schiusa delle uova, i pulcini erano liberi dal parassita, essendo stata l'infezione eradicata dall'immunità innata, ma conservavano nel genoma il *mitochondrial kinetoplast DNA minicircle* (kDNA) di *T. cruzi* (che ha un unico mitocondrio contenente una grande massa di DNA mitocondriale a ridosso della tasca flagellare, nota come *kinetoplast* DNA), evidenziato mediante *targeted prime TAIL-PCR, ibridizzazioni Southern*, clonaggio e sequenziamento. I minicircoli di kDNA del tripanosoma si sono integrati in regioni codificanti di vari cromosomi dei pulcini che, geneticamente mutati, hanno sviluppato una cardiomiopatia indotta da una patologia infiammatoria autoimmune, sintomo caratteristico del morbo di Chagas: le cellule mononucleate del sistema immunitario lisavano le fibre cardiache bersaglio, in assenza di parassiti

in situ. Le alterazioni del genotipo, derivanti dal transfer del DNA del tripanosoma nel DNA del pulcino, erano associate alla distruzione dei tessuti a opera dei linfociti effettori CD45+, CD8.d+, CD8a. Questi dati descrivono un'infezione da protozoi che può indurre, nell'ospite, una patologia autoimmune guidata geneticamente (Teixeira, 2011).

…nel coniglio

Conigli (famiglia: *Leporidae*, ordine: *Lagomorpha*) di 1-2 mesi di età, inoculati con tripomastigoti di *T. cruzi* del ceppo Colombia, sviluppano una patologia cardiaca, insieme ad alterazioni parassitologiche e immunologiche molto simili al quadro delle fasi acuta e cronica del morbo di Chagas umano.

Nella fase acuta, i danni cardiaci macroscopici sono caratterizzati da modesta cardiomegalia con dilatazione di atrio e ventricolo destri e, microscopicamente, da moderata miocardite focale.

La fase cronica è caratterizzata da moderata-marcata cardiomegalia, con ipertrofia e dilatazione dei ventricoli e assottigliamento della regione apicale del cuore (aneurisma apicale), in particolare a carico del ventricolo sinistro. Alla cineventricolografia[6] del ventricolo sinistro, nella fase cronica dell'infezione, si rilevano disfunzioni cardiache regionali, con il tipico rigonfiamento sistolico apicale (Figueiredo, 1986).

Una patologia simile al morbo di Chagas umano è stata indotta in conigli consanguinei del ceppo III/J, con inoculo sottocutaneo di tripomastigoti del ceppo Ernestina, causando lesioni cutanee callose e linfonodi satellitari ingrossati. La parassitemia era palese, ma non si sono registrati decessi durante la fase acuta dell'infezione. A 3 mesi dall'infezione, ormai in assenza di parassitemia rilevabile, l'evidenza dell'infezione in corso era denunciata dai titoli anticorpali specifici elevati e dalle reazioni cutanee ritardate contro un antigene microsomiale del parassita. Sei mesi dopo l'inoculo di *T. cruzi* sono state registrate alterazioni persistenti nell'ECG e, all'esame radiografico, profili cardiaci ingrossati. La sopravvivenza media è stata di 11,5+/-5,0 mesi e il 60% dei casi di morte istantanea è stato attribuito al morbo di Chagas: all'esame necroscopico, denunciavano insufficienza cardiaca o insufficienza cardiaca congestizia, cardiomegalia, dilatazione aneurismatica dell'apice del ventricolo sinistro e/o tromboembolia (Chagas disease, 2014). All'esame istologico, la miocardite era simile a quella dei pazienti affetti dal morbo di Chagas: infiltrazione linfocitaria e lisi dei cardiomiociti erano sempre presenti, ma non era dimostrabile la presenza di parassiti nelle lesioni. L'assenza dell'evidenza di necrosi dei cardiomiociti, indotta direttamente dal tripanosoma, contrastava nettamente con l'abbondanza di fibre muscolari distrutte, ma non infettate, in presenza di infiltrati di cellule mononucleate. Erano anche evidenziabili lesioni infiammatorie distruttive a carico dei muscoli scheletrici e della muscolatura intestinale, ganglioneurite e perdita di neuroni mienterici e parasimpatici.

Altre somiglianze tra il morbo di Chagas nell'uomo e nel coniglio erano: assenza di correlazione tra parassitemia e morbidità e/o mortalità, cardiomegalia con dilatazione delle cavità cardiache, formazione aneurismatica apicale del ventricolo destro, lesioni microscopiche distruttive muscolo-scheletriche e parietali nei segmenti intestinali infettati da *T. cruzi* (Teixeira, 1986).

l coniglio si conferma, quindi, modello animale particolarmente adatto per studi sul meccanismo, sulla patologia e sull'insorgenza ed evoluzione della cardiomiopatia nel morbo di Chagas. Modelli animali per lo studio del morbo di Chagas umano, in particolare di quelli sviluppati nel cane, nel macaco e nel babbuino sono reperibili in un altro articolo di questo libro.

Note

Nota 1. Amastigote è una cellula priva di flagelli esterni visibili o ciglia. Il termine è utilizzato principalmente per descrivere una certa fase nel ciclo vitale del protozoo *trypanosomatidae*. Alla morte della cellula parassitata, gli amastigoti di *T. cruzi* passano nel sangue per invadere altre cellule, soprattutto muscolari striate e cardiache, diventando tripomastigoti flagellati.

Nota 2. Tripomastigoti: cellule flagellate, sono la forma replicativa endocellulare di *T. cruzi*.

Nota 3. Tripanotione è una forma insolita di glutatione contenente due molecole di glutatione unite da un limker di spermidina (poliammina), trovato in protozoi parassiti come *Leishmania* e tripanosomi.

Nota 4. Triparedossina è una molecola redox attiva, appartenente alla superfamiglia delle tioredoss; è un costituente della cascata di eliminazione degli idroperossidi e può anche essere coinvolta in altri processi cellulari come la sintesi di DNA o nell'interazione ospite-parassita.

Nota 5. Il blocco atrioventricolare di I° grado è una patologia del sistema di conduzione del cuore nella quale si assiste a un allungamento dell'intervallo PR. Il blocco atrioventricolare di II° grado è un altro difetto del sistema di conduzione elettrico cardiaco: il termine fa riferimento a un blocco di conduzione tra l'atrio e i ventricoli. Il blocco atrioventricolare di II° grado è diagnosticato quando, alla lettura dell'elettrocardiogramma, si evidenzia che uno o più impulsi atriali non riescono a propagarsi ai ventricoli a causa di una conduzione alterata.

Nota 6. Fascio di His è parte del sistema di conduzione del cuore, formato da miocardio specifico. Conduce l'impulso elettrico cardiaco dal nodo atrio-ventricolare ai ventricoli (fig. 3).

Nota 7. Il nodo atrioventricolare, detto Nodo di Aschoff-Tawara, è il relais del sistema di conduzione del cuore di cui fa parte il fascio di His, formato da miocardio specifico. Il fascio si irradia dal nodo atrio-ventricolare, discende lungo il setto ventricolare dividendosi in due branche, una destra e una sinistra, per condurre l'impulso elettrico, generato nel nodo, ai rispettivi ventricoli.

Nota 8. La cineventricolografia permette di opacizzare la cavità del ventricolo sinistro: si inietta ad alta pressione, con un catetere, liquido di contrasto nella cavità ventricolare, e si studiano ai raggi X, registrandoli con una telecamera, i movimenti e i volumi cardiaci, e la frazione di eiezione: è così possibile determinare la presenza o meno di scompenso cardiaco grazie all'analisi del valore della frazione di eiezione del ventricolo sinistro.

Bibliografia

- Andrade, S. G., & Sadigursky, M., 1987; The conduction system of the heart in mice chronically infected with Tripanosoma cruzi: histopathological lesions and electrocardiographic correlations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro, vol. 82: pp. 59-66
- Bafort, J. M., Kageruka, P., and Timperman, G. T., 1973; A new, highly susceptible laboratory animal for Chagas's disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., vol. 67: pp. 434-435
- Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., et al., 2007; Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. JAMA vol. 298: pp. 2171–2181
- Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet N°340». World Health Organization. March 2013. Retrieved 23 February 2014
- DPDx – Trypanosomiasis, American. Fact Sheet. Centers for Disease Control (CDC). Retrieved 12 May 2010
- Figueiredo, F., Marin-Neto, J. A., Rossi, M. A., 1986; The evolution of experimental Trypanosoma cruzi cardiomyopathy in rabbits: further parasitological, morphological and functional studies. Int. J. Cardiol., vol. 10: pp. 277-290
- Guarner, J., Bartlett, J., Zaki, S. R., Colley, D. G., Grijalva, M. J., and Powell, M. R., 2001; Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of Trypanosoma cruzi in tissues throughout infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. vol. 65: pp. 152-158
- Maudlin, I., Holmes, P. H., Miles, M. A., ed. (2004). The Trypanosomiases. Wallingford: CAB International., p. 184 ISBN 9780851990347
- CS1 maint: Multiple names: editors list (link)Morris, S. A., Tanowitz, H., Factor, S. M., Bilezikian, J. P., and Wittner, M., 1988; Myocardial adenylate cyclase activity in acute murine Chagas' disease. Circulation Research. Vol. 62: pp. 800-810

– Nagajyothi, F., Machado, F. S., Burleigh, B. A., Jelicks, L., A., Scherer,P. E., Mukherjee, S., Lisanti, M. P., Weiss, L. M., Garg, N. J., and Tanowitz, H. B., 2012; Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. Cell Microbiol. vol 14: pp. 634–643
– Postan, M., Cheever, A. W., Dvorak, J. A., and McDaniel, J. P., 1986; A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/He mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio-X10/4. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., vol. 80: pp. 50-55 Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J. A., 2010; Chagas disease. Lancet vol. 375 (9723): 1388–1402
– *Rassi, A., Dias, J. C., Marin-Neto, J. A., Rassi, A., 2009: Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. Heart, vol. 95: pp. 524–34*
– Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J. A., 2010; Chagas disease. Lancet vol. 375 (9723): 1388–1402
– CS1 maint: Multiple names: authors list (link)Rassi, A., Jr, Rassi, A., Marcondes de Rezende, J., 2012; American trypanosomiasis (Chagas disease). Infectious disease clinics of North America vol. 26: pp. 275–291
– Teixeira, A. R. L., 1986; Chagas' disease in inbred III/J rabbits. Am J Pathol. vol. 124: pp. 363–365
– Teixeira, A. R. L., Gomes. C., Nits, N., Sousa A. O., Alves, R. M., Guimaro, M. C., Cordeiro. C., Bernal, F. M., Rosa, A., C., Hejnar, J., Leonardecz, E., Hecht, M. M., 2011: *Trypanosoma cruzi* in the Chicken Model: Chagas-Like Heart Disease in th Absence of Parasitism. http://dx.doi.org/10.137/journal.pntd.000.1000

LA RACCOLTA DI DATI SUGLI ANIMALI, NELLA SORVEGLIANZA E LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DELLE ZOONOSI NELL'UOMO

ALESSANDRO MANNELLI

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

I dati raccolti sugli animali possono essere utilizzati nell'ambito di due attività che giocano un ruolo centrale nella sanità pubblica: a) la sorveglianza epidemiologica, intesa come la raccolta di dati, continuativa nel tempo o periodica, sulle malattie nelle popolazioni, con l'obiettivo del controllo o dell'eradicazione; b) la valutazione del rischio (*risk assessment*, RA), che si basa su un un'analisi, dettagliata e trasparente, dei meccanismi e della sequenza di eventi, che possono portare a casi di malattia nell'uomo, o all'introduzione di agenti di zoonosi in territori indenni. La sorveglianza può fornire evidenze scientifiche come, per esempio, la frequenza di agenti patogeni in diverse specie animali e in diverse fasi dei cicli produttivi, che sono utili nel RA. D'altra parte, i risultati del RA possono essere usati per programmare la sorveglianza basata sul rischio (*risk-based surveillance*).

Nella programmazione della raccolta di dati e nell'interpretazione dei risultati delle indagini, è necessario definire il ruolo delle diverse specie animali nei cicli di trasmissione degli agenti di zoonosi. Nel caso di *Salmonella Enteritidis*, per esempio, il pollo domestico può servire da serbatoio e da fonte d'infezione per l'uomo. In questo caso, la sorveglianza e il controllo nei gruppi di galline ovaiole, con la riduzione della prevalenza dell'infezione sotto i livelli stabiliti a livello comunitario, sono state probabilmente misure efficaci per la tutela della salute pubblica. Infatti, nel corso degli anni, l'incidenza di salmonellosi nell'uomo nell'Unione Europea è andata incontro a una progressiva riduzione, come mostrato dai dati pubblicati annualmente da parte dell'autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) (EFSA and ECDC, 2015). Tale riduzione può essere in larga misura attribuita all'attività di sorveglianza e controllo dell'infezione negli animali.

Per altre zoonosi, gli animali possono essere i serbatoi naturali degli agenti patogeni, ma la trasmissione all'uomo può avvenire per mezzo di artropodi vettori. La borreliosi di Lyme, causata da spirochete del gruppo *Borrelia burgdorferi* sensu lato e trasmessa, in Europa occidentale, dalla zecca *Ixodes ricinus*, è la zoonosi trasmessa da vettori più frequente nelle aree temperate dell'emisfero settentrionale. La variabilità delle forme cliniche nell'uomo e negli animali suscettibili, con la conseguente assenza di una univoca *case-definition* ha, finora, impedito l'inclusione di questa malattia nella raccolta di dati da parte delle autorità competenti dell'Unione Europea. Inoltre, il ciclo di trasmissione degli agenti causali è molto complesso, in quanto coinvolge diverse specie di vertebrati ed è influenzata da fattori ambientali e sociali. Per questi motivi, la borreliosi di Lyme pone interessanti sfide nella sorveglianza e nel RA.

Il rischio di borreliosi di Lyme per l'uomo dipende dalla frequentazione di aree naturali, soprattutto boschive, e dall'abbondanza di zecche in grado di trasmettere *B. burgdorferi* sl, che può essere stimata con la raccolta diretta dei vettori e con successive analisi di laboratorio per svelare l'infezione. La raccolta di dati negli animali potrebbe fornire utili informazioni per la tutela della salute pubblica. Il cane, per esempio, sebbene abbia un ruolo trascurabile nel ciclo di trasmissione delle spirochete, ha una probabilità di esposizione alle zecche superiore all'uomo e può produrre anticorpi contro B. *burgdorferi* sl. Quindi, la ricerca di anticor-

pi in campioni di cani raccolti con un programma definito potrebbe fornire utili indicazioni su variazioni nello spazio e nel tempo del rischio di esposizione alle zecche infette anche per l'uomo. L'interpretazione di dati sulla sieroprevalenza nel cane, in funzione del rischio di infezione per l'uomo, è però reso complesso da diversi fattori, fra cui l'accuratezza dei test diagnostici per la messa in evidenza di anticorpi nel cane.

Per favorire l'interpretazione di dati raccolti sul cane (o altri animali sentinella), è stato costruito un semplice modello matematico (Mannelli *et al*., 2012). Nel modello, la probabilità di trovare una zecca infetta con *B. burgdorferi* sl in un tratto di territorio di 100 m^2 è stato definita come rischio acarologico. E' stata poi ipotizzata una relazione fra variazioni del rischio acarologico e la prevalenza di anticorpi contro *B. burgdorferi* sl nel cane. Sulla base dei risultati del modello, si possono identificare condizioni di aumento del rischio di infezione anche per l'uomo. Ulteriori studi potrebbero aiutare a interpretare meglio questi dati raccolti sugli animali, in funzione della tutela della salute dell'uomo.

In conclusione, la raccolta di dati sugli animali riveste un ruolo centrale nella prevenzione e nel controllo di alcune zoonosi nell'uomo, mentre, in altri casi, tale ruolo potrebbe essere notevolmente sviluppato. Per la sorveglianza di malattie infettive complesse, quali sono le zoonosi, è indispensabile l'integrazione di dati da fonti diverse, in particolare sia quelli di origine veterinaria sia quelli relativi alla medicina umana. Infatti, solo con la condivisione di dati e con l'integrazione di competenze di personale e di enti diversi si può realizzare l'approccio "One Health" che viene attualmente incoraggiato.

Bibliografia

- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013*. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 165 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991
- Mannelli, A., Martello, E., Tomassone, L., Calzolari, M., Casalone, C., De Meneghi, D., Dottori, M., Estrada-Peña, A., Fabbi, M., Ferreri, L., Ferroglio, E., Luini, M., Nicolau Solano, S., Ortega, C., Pautasso, A., Prati, P., Vesco, U. 2012. *Inventory of available data and data sources and proposal for data collection on vector-borne zoonoses in animals*. EFSA Supporting Publication 2012; 9(3):EN-234, 189 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2012.EN-234

2.3
MODELLI DI MALATTIE NEOPLASTICHE

I TUMORI SPONTANEI NEGLI ANIMALI COME MODELLI DI STUDIO PER L'ONCOLOGIA COMPARATA

PAOLO CASCIO, RAFFAELLA DE MARIA

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Ormai da alcuni anni si è ampiamente diffusa in ambito scientifico la consapevolezza che i tumori spontanei degli animali domestici rappresentano validi modelli sperimentali per lo studio della biologia del cancro e per lo sviluppo di nuove strategie e agenti terapeutici, i cui risultati sono a tutti gli effetti validi e utilizzabili anche in ambito dell'oncologia umana. E' lecito, quindi, chiedersi quali siano gli aspetti peculiari che costituiscono i punti di forza del cosiddetto "*Modello degli animali domestici*" e che hanno permesso all'oncologia comparata di valicare gli angusti confini di un interesse puramente veterinario, arrivando a ritagliarsi un ruolo di primo piano anche nel panorama estremamente ampio degli studi sui tumori umani, come dimostra il numero sempre crescente di articoli di oncologia comparata che vengono pubblicati su importanti riviste scientifiche internazionali (1-7).

Un primo motivo del successo scientifico di questo approccio sperimentale risiede nell'importante considerazione che le neoplasie degli animali domestici (*in primis* riferendosi a cane e gatto, ma non solo) si sviluppano spontaneamente, mentre i modelli sperimentali di laboratorio normalmente basati sull'utilizzo di piccoli roditori (topi, ratti, cavie) inducono i tumori o tramite il ricorso a cancerogeni artificiali di natura chimico-fisica o tramite trapianti, spesso in presenza di modificazioni artificiali del sistema immunitario, il che solleva dubbi sulla reale possibilità di generalizzare i risultati ottenuti. Importanti scoperte effettuate nel corso degli ultimi decenni hanno, infatti, permesso di evidenziare in maniera molto chiara il ruolo svolto dal sistema immunitario sia nel contrastare la crescita sia nel modificare le caratteristiche fenotipiche dei tumori tramite una progressiva selezione di varianti più aggressive e più adatte a sfuggire al controllo immunitario (8,9).

La progressiva delucidazione di questi meccanismi immunologici anti-tumorali, che riguardano sia l'immunità innata (costituita essenzialmente dall'insieme delle cellule fagocitiche, dalle cellule NK - natural killer - e dalle citochine) sia quella acquisita (basata principalmente sull'azione degli anticorpi e dei linfociti B e T) ha permesso di chiarire come l'insorgenza e il successivo sviluppo della malattia tumorale siano il risultato di una continua e dinamica interazione tra le proprietà peculiari (in particolare l'esuberanza proliferativa e la resistenza a ogni meccanismo di controllo e autolimitazione) delle cellule neoplastiche con le multiformi attività di contrasto messe in atto a ondate successive dal sistema immunitario (10,11).

La comprensione sempre più approfondita dei complessi networks cellulari e molecolari che operano a livello dell'interfaccia tumore-sistema immunitario viene sempre più sfruttata a scopo clinico tramite nuovi farmaci (es. anticorpi monoclonali) o nuove strategie terapeutiche (es. vaccinazioni o re-infusione nei pazienti di linfociti citotossici $CD8^+$ anti-tumorali espansi in vitro) miranti a ottenere una selettiva eliminazione delle cellule cancerose grazie a un potenziamento diretto del sistema immunitario o tramite la rimozione di meccanismi inibitori che ne limitano l'efficacia anti-neoplastica (12-14).

Alla luce di quanto esposto fino ad ora, risulta dunque facilmente comprensibile come dati ottenuti dallo studio di tumori spontanei, che si sviluppano pertanto nel contesto di un sistema immunitario perfettamente funzionante, abbiano un'importanza equivalente e siano sotto

molti punti di vista complementari rispetto a risultati ricavati utilizzando animali da laboratorio che, se da un lato permettano un migliore controllo di alcune variabili di tipo genetico e ambientale, dall'altro si caratterizzano normalmente per la presenza di un sistema immunitario farmacologicamente o geneticamente pesantemente compromesso quando non del tutto inattivo.

Un ulteriore aspetto che rende estremamente vantaggioso l'utilizzo del modello degli animali domestici in oncologia comparata risiede nella fondamentale osservazione che molte delle neoplasie spontanee che colpiscono gli animali d'affezione presentano un comportamento biologico, molecolare e istopatologico molto simile (quando non del tutto identico) a quello che si riscontra nei corrispondenti tumori umani. Questa considerazione, che può apparire abbastanza scontata considerando che stiamo comunque parlando di mammiferi superiori che condividono, ovviamente, i principali meccanismi cellulari, biochimici e biomolecolari di base che presiedono ai processi di differenziamento, accrescimento, adattamento e riproduzione cellulari, in realtà ha faticato non poco a essere accettata soprattutto in ambito di medicina umana, dove paradossalmente sembrava quasi che le neoplasie dell'uomo dovessero avere più somiglianze con quelle del topo piuttosto che con quelle del cane o del gatto. Questa sorta di diffidenza è stata però ormai ampiamente superata nel corso di questi ultimi anni, e oggi è ampiamente accettato che molte delle neoplasie spontanee che affliggono gli animali domestici rappresentano un valido modello sperimentale per effettuare studi di tipo biochimico, biomolecolare e farmacologico, i cui risultati possono poi essere in buona parte traslati direttamente in ambito di medicina umana.

Ulteriori considerazioni che rendono estremamente utile il ricorso agli animali domestici riguardano l'elevata taglia corporea, le risposte simili agli agenti citotossici e una più breve durata della vita, che sono tutti elementi di notevole importanza per studi che si ripropongano di traslare quanto più velocemente possibile i risultati dall'oncologia veterinaria a quella umana (15,16).

Tra le neoplasie di interesse veterinario che sono più comunemente studiate nell'ottica dell'oncologia comparata in virtù dell'estrema somiglianza da un punto di vista sia anatomico e istopatologico, sia genetico, biomolecolare e del comportamento biologico con il corrispondente tumore umano, possiamo innanzitutto citare l'osteosarcoma (OSA) canino. L'OSA rappresenta, infatti, una delle principali categorie di neoplasie maligne che forniscono la migliori possibilità di effettuare studi comparati uomo-cane, essendo in entrambi il tumore osseo più frequente e presentando molteplici analogie sia per quanto riguarda le caratteristiche cliniche e il comportamento biologico sia per le alterazioni evidenziate a livello molecolare. Numerosi studi hanno infatti contribuito a definire il ruolo di specifici pathways molecolari nella patogenesi dell'OSA, dimostrando l'importanza della valutazione di alcuni parametri quali ploidia, valutazione dell'attività proliferativa e delle eventuali mutazioni geniche, alterazione dell'espressione di oncogeni e di geni oncosoppressori, e molti di questi meccanismi sono condivisi tra l'uomo e i carnivori domestici (2,5,15,17). L'OSA umano rappresenta una neoplasia a elevata malignità che colpisce principalmente i soggetti in età pediatrica ed è caratterizzata da una prognosi sfavorevole, nonostante l'applicazione di terapie specifiche, in conseguenza dell'alta incidenza di metastasi polmonari. La prognosi dei pazienti colpiti da malattia metastatica al momento della diagnosi o per coloro che mal rispondono alla chemioterapia risulta, infatti, ancora insoddisfacente, visto che solo il 20-40% degli ammalati presenta una sopravvivenza libera da malattia pari ad almeno 5 anni.

Similmente, anche nella specie canina l'OSA (che rappresenta l'85% delle forme tumorali a localizzazione scheletrica nel cane) rappresenta una delle neoplasie più aggressive e meno responsive ai trattamenti attualmente disponibili a causa del suo elevato potere di metastatizzazione. Infatti, nonostante il trattamento combinato di chirurgia e chemioterapia, solo il 20-

25% dei cani sopravvive oltre i 2 anni dall'intervento, mentre i restanti pazienti sviluppano metastasi polmonari in genere entro l'anno.

Appare, pertanto, giustificabile l'utilizzo dell'OSA canino quale modello sperimentale, applicabile anche all'uomo, sia per lo studio di molecole e pathways specificamente coinvolti nello sviluppo e nella progressione neoplastica (quali, ad esempio, HSP90, via di segnale Wnt/beta-catenina, survivina, GSK3B, CXCR4/CXCL12, recettori tirosin chinasici, p53, Rb, CDK4, MMP2, MMP9, TIMPs, RANK/RANKL/OPG), sia per valutare l'efficacia di sostanze inibitrici delle molecole suddette.

Un'altra neoplasia degli animali domestici che mostra diverse analogie con il corrispondente tumore umano da un punto di vista istologico, molecolare e per comportamento clinico è il melanoma maligno canino (MMC) (18). Il MMC è il più comune tumore orale nel cane e, nonostante i progressi terapeutici, circa il 75-80% dei cani non sopravvive a un anno dalla diagnosi. Tutti i melanomi orali nei cani sono considerati maligni (tasso metastatico superiore all'80%), mentre per quelli digitali e sub-ungueali è stato riportato un tasso di disseminazione metastatica nel 50-58% dei casi. Il tipo istologico (epitelioide, fusiforme e misto) e il grado di pigmentazione non sono considerati fattori prognostici, e gli unici parametri che hanno dimostrato influenzare l'evoluzione della malattia sono la localizzazione e la stadiazione clinica.

Recentemente, diversi studi hanno dimostrato che sia il MMC che il melanoma maligno umano presentano profonde somiglianze a livello molecolare soprattutto per quanto riguarda l'espressione di recettori tirosinchinasici (TKRs) e di antigeni associati al tumore (TAA) (19,20). Complessivamente questi dati rendono il MMC un modello pre-clinico adatto per lo studio e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici come l'immunoterapia e l'uso di farmaci anti-tirosinchinasici (TKI), i cui risultati potranno poi essere direttamente utilizzati per pianificare sperimentazioni cliniche nell'uomo (5,21).

Un altro tumore degli animali domestici che presenta caratteristiche cliniche, patologiche e biomolecolari analoghe a quello umano e si presta perciò ad essere un buon modello per lo sviluppo di nuovi markers prognostici e per lo studio di nuove terapie farmacologiche è anche il mesotelioma del cane (22,23). Il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM) è una neoplasia estremamente aggressiva che origina dal mesotelio che riveste la superficie della cavità pleurica, normalmente a seguito di esposizione diretta o indiretta a fibre di amianto. Dati epidemiologici indicano che nei prossimi 30 anni questa patologia causerà circa 250.000 decessi in Europa Occidentale (17). Infatti, benché attualmente siano stati adottati provvedimenti molto severi per limitare ulteriori esposizioni all'amianto, il periodo di latenza estremamente prolungato della malattia comporterà un drammatico incremento dell'incidenza della patologia nei prossimi anni. La situazione in Italia riguardo questa forma tumorale appare estremamente grave. Dall'archivio del Registro Nazionale Mesoteliomi (ReNaM), aggiornato a dicembre 2011, emergono informazioni relative a 15.845 casi di Mesotelioma Maligno diagnosticati in Italia dal 1993 al 2008 (1056 in media all'anno) e di questi ben il 93% a carico della pleura; ulteriori 1464 casi di malattia sono stati segnalati nel corso del solo 2012. L'incidenza del MPM, è strettamente correlata con l'esposizione, sia di natura professionale sia ambientale e domestica, alle fibre di amianto. In Italia, infatti, l'amianto è stato estratto e ampiamente utilizzato fino alla metà degli anni Ottanta del secolo scorso per la produzione di cemento-amianto, filati e tessuti, materiali d'attrito, costruzione e manutenzione di rotabili ferroviarie. Va inoltre considerato che su tutto il territorio nazionale vi era, e vi è in parte tuttora, una diffusa presenza di coibenti e altri manufatti in amianto.

Anche nel cane l'insorgenza della neoplasia è strettamente dipendente dall'esposizione ambientale alle fibre di amianto, e campioni di polmone di animali affetti da MPM presentano una quantità di fibre di asbesto e di corpi ferruginosi molto maggiore rispetto a quella di animali sani (25-27).

Da un punto di vista clinico, il MPM è una patologia caratterizzata da esito generalmente infausto a causa della generale resistenza a tutti i trattamenti terapeutici disponibili (28), per cui a prescindere dalla terapia utilizzata la mediana di sopravvivenza risulta inferiore a un anno (29). In considerazione, quindi, del fatto che il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM) canino è eziologicamente, clinicamente, morfologicamente e dal punto di vista biomolecolare simile a quello umano, che i mesoteliomi in animali residenti in ambienti urbani/industriali presentano, come nell'uomo, un'incidenza superiore rispetto ai residenti in aree extraurbane e che il periodo di latenza nel cane è sensibilmente inferiore, appare estremamente indicato l'utilizzo del mesotelioma spontaneo canino come modello sperimentale per studi farmacologici con ricadute e applicazioni valide anche in ambito umano. Nel caso specifico del MPM, particolare importanza riveste, inoltre, la considerazione che il cane condivide con l'uomo gli stessi ambienti di vita ed essendo, quindi, sottoposto agli stessi rischi ambientali, potenzialmente può svolgere un'importantissima funzione di specie sentinella.

Un ulteriore tumore spontaneo che rappresenta un modello eccellente in oncologia comparata è il tumore mammario felino. Questo tumore colpisce in prevalenza gatte intere e tende nella sua progressione tumorale a perdere l'espressione dei recettori per ER (recettore per estrogeni) e PR (recettore per progesterone). Questa sua caratteristica lo rende molto simile dal punto di vista biologico al tumore *" hormone resistent"* che colpisce la donna, contro cui non esistono terapie biologiche e che ha una prognosi negativa. Studi recenti in oncologia comparata hanno inoltre dimostrato che entrambi i tumori in queste due specie sono molto simili dal punto di vista clinico istologico e molecolare (30-32).

Il tumore mammario che colpisce la popolazione canina invece insorge nelle cagne sottoforma di un istotipo misto e uno semplice con un'incidenza delle due forme del 50%. Da un punto di vista comparato solo la forma semplice è analoga a quella umana, mentre la forma mista non è presente nella popolazione umana (33).

I tumori appena descritti sono quelli maggiormente studiati in oncologia comparata e sui quali esiste una significativa documentazione scientifica. Malgrado ciò, in questo capitolo verrà fatto cenno anche ad altri tumori spontanei che insorgono negli organismi acquatici quali i pesci e i molluschi. Sebbene essi siano degli organismi filogeneticamente lontani dai mammiferi e quindi differenti anche dal punto di vista fisiologico e immunologico, rappresentano dei modelli molto interessanti per quanto riguarda l'effetto di sostanze nocive presenti negli ambienti acquatici e per il meccanismo di cancerogenesi da esse mediato. Diversi lavori hanno infatti dimostrato che questi organismi, in presenza di particolari sostanze, sviluppano tumori a livello sia della cute sia del sistema nervoso, rappresentando quindi delle importanti sentinelle per il monitoraggio ambientale (34,35).

Bibliografia

1. MacEwen, E. G. (1990) Cancer and Metastasis Rev. 9, 125-36.
2. Vail, D. M., and MacEwen, E. G. (2000) Cancer Invest. 18, 781-92.
3. McNiel, E. A. (2001) Clin Orthop Relat Res. 382, 21-7.
4. Hansen, K., and Khanna, C. (2004) Eur J of Cancer. 40, 858-880.
5. Paoloni, M., and Khanna, C. (2008) Nat Rev Cancer. 8, 147-56.
6. LeBlanc, A.K., et al. (2016) Sci Transl Med. 8, 1-4.
7. Khanna, C., et al. (2006) Nat Biotechnol. 24, 1065-6.
8. Dunn G.P., et al. (2002) Nature Immunol. 3, 991-8.
9. Khong H.T., and Restifo N.P. (2002) Nature Immunol. 3, 999-1005.
10. Dunn G.P., et al. (2004) Annu. Rev. Immunol. 22, 329-60.
11. Leen A.M., et al. (2007) Annu. Rev. Immunol. 25, 243-65.
12. Sharma P., and Allison, J.P. ((2015) Science, 348, 56-61.
13. Rosenberg S.A., and Restifo N.P. (2015) Science, 348, 62-8.
14. Schumacher T.N. and Schreiber R.D. (2015) Science, 348, 69-74.
15. Paoloni, M. C., and Khanna, C. (2007) Vet Clin North Am Small Anim Pract. 37, 1023-32.
16. Gordon, I.K. and Khanna, C. (2010) ILAR J. 51, 214-220.
17. Mueller, F., Fuchs, B., and Kaser-Hotz, B. (2007) Anticancer Res. 27, 155-64.
18. Ramos Vara JA Vet Pathol. 2000 Nov;37(6):597-608. 2000
19. Satzger et al., Dermatology. 2010;220(1):77
20. Thamm et al Melanoma Res. 2010 Feb;20(1):35-42
21. Thamm el al Clin Cancer Res. 2010 Mar 1;16(5):1498-508.
22. Harbison M.L., and Godleski J.J. (1983) Vet. Pathol. 20, 531-40.
23. Head K.W. et al., Tumors in Domestic Animals, 2008
24. Peto J. et al., (1999) Br. J. Cancer, 79, 666-72.
25. Glickman L.T. et al., (1983) Env. Res. 32, 305-13.
26. De Nardo P., Rap. ISTISAN 1996/38
27. Bellis D. et al., (2005) Il Prog. Vet., anno LX, 1, 9-15.
28. Alberts A.S. et al., (1988) J. Clin. Oncol., 6, 527-35.
29. Robinson B.W. et al., (2005) Lancet, 366, 397-408.
30. De Maria R. et al Cancer Res. 2005 Feb 1;65(3):907-12.
31. Maniscalco L. et al BMC Vet Res. 2013 Apr 15;9:80.
32. Zappulli V. et al. Vet Pathol. 2015 Jan;52(1):46-60
33. Pena L. et al Vet Pathol. 2014 Jan;51(1):127-45.
34. Masahito P. et al Jpn J Cancer Res. 1988 May;79(5):545-55
35. Masahito P. et al Pigment. J Invest Dermatol. 1989 May;92(5 Suppl):266S-270S

L'OSTEOSARCOMA DEL CANE COME MODELLO DI STUDIO IN ONCOLOGIA COMPARATA

MARIARITA ROMANUCCI, LAURA BONGIOVANNI, MARCELLA MASSIMINI

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

Introduzione (caratteristiche generali, incidenza, fattori eziologici)

L'osteosarcoma (OSA) rappresenta la più comune neoplasia maligna del tessuto osseo sia nel cane sia nella specie umana, in particolare in età pediatrica, sebbene l'incidenza di tale forma neoplastica risulti 10 volte maggiore nella specie canina rispetto a quella umana. In entrambe le specie, l'OSA mostra numerose analogie riguardanti sia le caratteristiche clinico-patologiche e molecolari, sia la risposta ai trattamenti terapeutici tradizionali, quali la chirurgia e la chemioterapia, tali da rendere la specie canina un valido modello di patologia spontanea per lo studio di questa tipologia tumorale (Fenger *et al*., 2014). Sia nel cane che nell'uomo, l'OSA mostra una distribuzione di frequenza bimodale, sebbene il picco principale di incidenza della malattia corrisponda all'età adolescenziale nella specie umana (10-14 anni), mentre nel cane l'OSA si registra prevalentemente in soggetti di età media o anziani (7-9 anni). In passato, l'incidenza dell'OSA veniva considerata maggiore nei soggetti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile, sebbene studi più recenti suggeriscano una uguale distribuzione nei due sessi in entrambe le specie (Ottaviani e Jaffe, 2009; Ehrhart *et al*., 2013). Le sedi principali di sviluppo dell'OSA corrispondono alla regione metafisaria delle ossa lunghe dello scheletro appendicolare sia nell'uomo sia nel cane, con predilezione per le regioni maggiormente deputate al sostegno del peso corporeo, rappresentate da radio distale e omero prossimale nel cane, e femore distale, tibia prossimale e omero prossimale nella specie umana (Withrow e Wilkins, 2010; Fenger *et al*., 2014). Nell'uomo, il picco di comparsa della malattia corrispondente alla fase dello 'scatto' accrescitivo puberale suggerisce una stretta correlazione tra la rapidità della crescita ossea e lo sviluppo tumorale. Il prevalente sviluppo dell'OSA in individui di maggior altezza e in sedi anatomiche caratterizzate da crescita più elevata suggerisce anch'esso un ruolo importante dei fattori di crescita del tessuto osseo nella patogenesi della neoplasia (Longhi *et al*., 2005). Nel cane, sebbene l'OSA si sviluppi prevalentemente in soggetti di età avanzata, l'associazione tra l'insorgenza della neoplasia e la crescita ossea è supportata dalla maggiore prevalenza della malattia in soggetti appartenenti a razze di taglia grande o gigante e, a tal proposito, la taglia e il peso elevati rappresentano i principali fattori predittivi per lo sviluppo della neoplasia (Fenger *et al*., 2014). L'eziologia dell'OSA è pressoché sconosciuta in entrambe le specie, sebbene sia possibile ipotizzare una complessa interazione tra fattori fisici e ambientali, suscettibilità genetica e aberrazioni molecolari acquisite (Fenger *et al*., 2014). Esempi di fattori eziologici noti sia nell'uomo sia nel cane includono le radiazioni ionizzanti (complicazione rara, con lungo tempo di latenza), nonché le alterazioni del tessuto osseo conseguenti a infarti ossei o osteomielite cronica (Ottaviani e Jaffe, 2009; Fenger *et al*., 2014).

Morfologia, Istologia e Grading

L'OSA canino si presenta con caratteristiche cliniche e istologiche eterogenee, dove il grado tumorale, insieme ai livelli plasmatici di AP (fosfatasi alcalina), sembrano essere correlati ai tempi di sopravvivenza e avere quindi un importante significato prognostico (Kir-

pensteijn *et al*., 2002).

Aspetti macroscopici: l'apparenza macroscopica e radiografica dell'OSA è variabile ed è fortemente influenzata dalla quantità e natura della matrice ossea prodotta dalle cellule tumorali, dalla distruzione di osso normale, sempre presente e che si accompagna alla formazione di tessuto osseo reattivo a partire dall'endostio e dal periostio (Thompson e Pool, 2002). Alcune forme di OSA sono predominantemente osteolitiche, alcune sono produttive, altre sono forme miste che presentano sia aspetti distruttivi sia proliferativi. Lesioni di tipo osteolitico si osservano prevalentemente in associazione ad alcuni sottotipi che verranno descritti nel paragrafo successivo); includono l'OSA scarsamente differenziato, l'OSA osteoblastico non produttivo, l'OSA condroblastico, circa il 50% di OSA fibroblastici, molti OSA telangectasici, quelli a cellule giganti e alcuni tipi combinati. Al contrario, OSA scarsamente differenziato, l'OSA osteoblastico non produttivo e l'OSA fibroblastico, presentano una matrice di consistenza molle, pallida, che contiene piccole aree di tessuto mucoide e necrosi. L'OSA condroblastico solitamente produce matrice cartilaginea pallida e lucente, spesso visibile all'esame macroscopico; mentre l'OSA teleangectasico risulta caratterizzato dalla presenza di sangue e ampie emorragie, aspetto che lo rende spesso difficile da distinguere macroscopicamente dall'emangiosarcoma (Thompson e Pool, 2002).

Classificazione istopatologica: l'OSA è un tumore maligno caratterizzato dalla formazione di osteoide, osso immaturo, o entrambi, da parte delle cellule tumorali (Misdorp e Hart, 1979). Gli OSA possono essere classificati in base al pattern istologico predominante, che può variare molto da tumore a tumore e rendere difficoltosa la diagnosi in caso di prelievi bioptici di scarse dimensioni o inadeguati. La classificazione istologica che segue prevede la distinzione dell'OSA dal punto di vista morfologico, e ha permesso l'identificazione di correlazioni tra il sottotipo istologico, la prognosi e/o la risposta alla terapia (Thompson, 2007).

In base alla classificazione della *World Health Organization* (WHO) (Slayter *et al*., 1994), l'OSA canino può essere distinto in:

- OSA osteoblastico: è caratterizzato dalla la presenza di osteoblasti anaplastici e gruppi di cellule fusate. Le cellule presentano nuclei ipercromatici, eccentrici, con citoplasma basofilo. Sulla base della quantità di matrice ossea prodotta dalle cellule tumorali è possibile subclassificare questo gruppo in: *non produttivo*, nel quale si osservano aree di osteolisi associate ad una lieve risposta da parte del periostio; anche se indicato come "non produttivo" una minima quantità di matrice osteoide è comunque prodotta (Slayter et al., 1994); *moderatamente produttivo*, nel quale anche radiograficamente si osservano quadri misti di distruzione e produzione di tessuto osseo, con moderata deposizione di matrice ossea; *produttivo*, nel quale si osserva un'abbondante produzione di matrice neoplastica all'interno dell'osso e a livello del periostio (fig. 1A).
- OSA condroblastico: le cellule mesenchimali maligne producono direttamente matrice osteoide e matrice cartilaginea (fig. 1B). Nel caso in cui le due matrici risultino separate, l'esame bioptico presenta dei limiti, in quanto il prelievo in una zona dove c'è solo matrice cartilaginea potrebbe portare a diagnosi errata di condrosarcoma (Slayter *et al*., 1994).
- OSA fibroblastico: consiste in una popolazione di cellule fusate simili a quelle del fibrosarcoma (fig. 1C). La prognosi per questo tipo di tumore, sia nel cane sia nell'uomo, è considerata migliore rispetto agli altri (Thompson, 2007).
- OSA teleangectasico: è un tumore aggressivo e osteolitico, caratterizzato da formazioni cistiche ripiene di cellule ematiche (fig. 1D), difficilmente differenziabili dal punto di vista macroscopico dall'emangiosarcoma. Le lacune ematiche però si presentano circondate nell'OSA da cellule mesenchimali neoplastiche e non da endotelio. Nel cane, così come nell'uomo, tale sottotipo si associa a una prognosi più sfavorevole (Thompson, 2007).

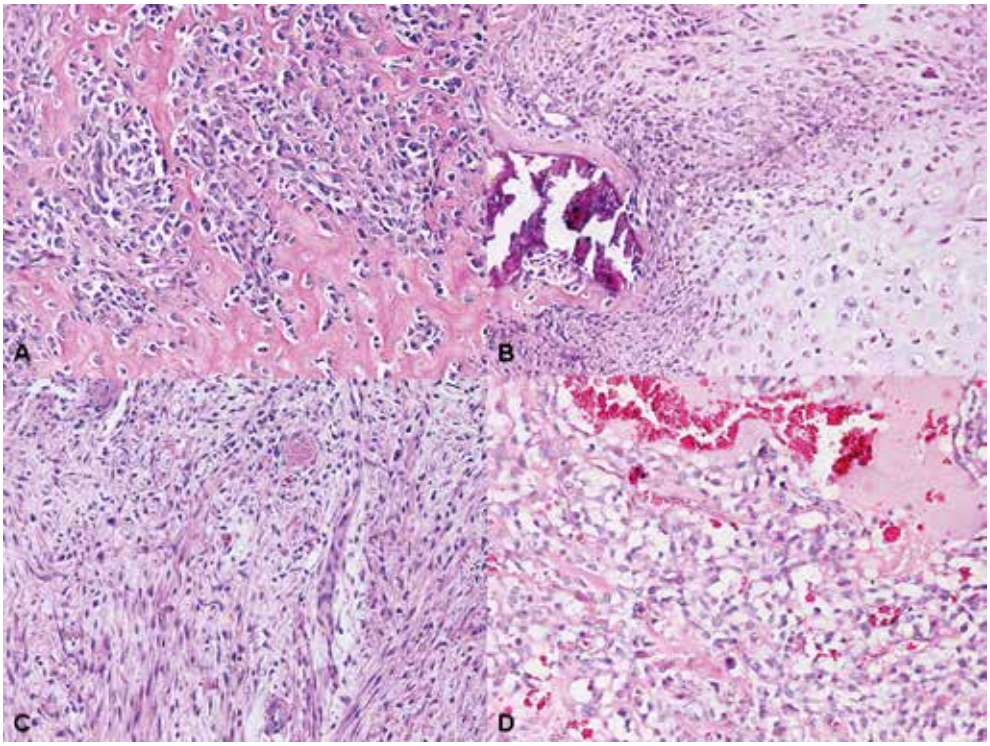


Fig. 1. Sottotipi istologici di osteosarcoma (OSA) canino: (A) OSA osteoblastico produttivo; (B) OSA condroblastico; (C) OSA fibroblastico; (D) OSA teleangectasico (colorazione Ematossilina-Eosina; 200x)

– OSA a cellule giganti: si osservano quadri paragonabili a quelli dell'OSA osteoblastico non produttivo, a eccezione della presenza di cellule giganti neoplastiche (Thompson e Pool, 2002). Talvolta tali cellule possono essere numerose, tanto da far erroneamente diagnosticare un tumore a cellule giganti. La presenza della produzione di osteoide da parte delle cellule neoplastiche permette di escludere tale forma tumorale (Thompson, 2007).
– OSA scarsamente differenziato: le cellule che lo compongono possono presentare una diversa morfologia, assomigliando alle piccole cellule tipiche dello stroma del midollo osseo o a grandi cellule che ricordano le cellule dei sarcomi indifferenziati.

Gradazione istologica: in Medicina Veterinaria viene utilizzato un sistema di gradazione istologica per l'OSA che prende in considerazione: il grado di pleomorfismo cellulare; il numero di mitosi; la quantità di matrice extracelluare; la percentuale di cellule neoplastiche; la presenza di necrosi. In base a tali caratteristiche sono stati descritti tre gradi istologici: GI, GII, GIII, caratterizzati da malignità crescente (Kirpenstejin *et al*., 2002). In particolare, l'OSA ad alto grado (grado III), associato con una diminuzione significativa del tempo di sopravvivenza (ST) e dell'intervallo libero dalla malattia (DFI) presenta un elevato rapporto cellule: matrice, presenza di matrice immatura e caratteristiche citologiche maligne come elevato pleomorfismo, indice mitotico elevato, invasione vascolare, abbondanza di tessuto necrotico

e invasività (Powers, 1999; Kirpensteijn *et al*., 2002). Le variabili associate a una riduzione dei tempi di sopravvivenza sono rappresentate da numero di mitosi e presenza di cellule tumorali nei vasi sanguigni (Kirpensteijn *et al*., 2002). Dal punto di vista clinico, fattori prognostici negativi riguardo l'OSA appendicolare, correlati a un ridotto ST e minore DFI, sono rappresentati da aumentati livelli di AP nel plasma (Kirpensteijn *et al*., 2002), localizzazione a livello di omero prossimale (Boerman *et al*., 2012), coste o scapola (Morello *et al*., 2011), giovane età, coinvolgimento dei linfonodi regionali, stadio clinico III (presenza di metastasi a distanza ad altre ossa o organi) (Boston *et al*., 2006; Morello *et al*., 2011), dimensioni della massa tumorale e incompleta escissione chirurgica (Morello *et al*., 2011).

In tab. 1 (modificata da Withrow e Wilkins, 2010; Morello *et al*., 2011; Fenger *et al*., 2014) sono riportate le principali caratteristiche dell'OSA canino e umano, mettendo in evidenza l'elevato grado di analogia presente tra le due specie.

Caratteristiche molecolari

La ristretta variazione genetica dovuta alla forte selezione umana delle razze canine, insieme all'avanzamento delle tecnologie genomiche e allo sviluppo di reagenti specifici per il cane, ha permesso negli ultimi anni una più facile identificazione delle basi genetiche dei tumori canini. Infatti, in seguito al sequenziamento dell'intero genoma del cane (Lindblad-Toh *et al*., 2005), sono state osservate forti analogie genetiche con l'uomo, incluse le alterazioni molecolari dei principali *pathways* legati alla progressione tumorale all'amplificazione dei più comuni oncogeni già noti nell'oncologia umana (Fowles *et al*., 2016).

Le evidenze scientifiche più significative per l'utilizzo del cane come modello nello studio comparato dell'OSA derivano da studi che paragonano gli interi profili d'espressione tumorali delle due specie tramite l'utilizzo di piattaforme array di oligonucleotidi. Paoloni *et al*. (2009) hanno confrontato il profilo genetico di OSA canini e pediatrici umani con il fine di valutare il livello di somiglianza tra le specie e di identificare dei target legati all'aggressività del tumore nelle due specie. L'analisi dei risultati, oltre a mostrare che la base genetica dell'OSA è altamente conservata e mutualmente condivisa tra uomo e cane, ha evidenziato che i principali geni caratteristici della patologia includono quelli associati con la matrice extracellulare, le componenti strutturali, gli elementi leganti il calcio, i processi di sviluppo osseo e la morfogenesi. Inoltre, lo studio ha identificato quattro geni (geni "*dog-like*") con alterata espressione in tutti i casi di OSA canino ma variabili nell'uomo, suggerendone una possibile correlazione con il grado di malignità e l'insorgenza di metastasi, data la maggiore velocità di progressione tumorale nel cane. Infatti, è stato osservato che gli ultimi due, tra i seguenti quattro geni "*dog-like*" *TFPI2*, *RBP4*, *IL8*, *SLCLA3*, quando overespressi nell'uomo, sono associati a prognosi infausta. Al contrario, molti geni implicati nella patogenesi dell'OSA sono stati osservati prima nell'uomo e successivamente caratterizzati anche nel cane, quali *RB1* ed *ERBB2*, gli oncosoppressori *PTEN* e *P53* ed *EZR* e *c-MET*, associati alla presenza di metastasi (Paoloni *et al*., 2009).

Con il fine di identificare altri geni coinvolti nella patogenesi dell'OSA sia canino sia umano, Angstadt *et al*. (2012) hanno utilizzato l'aCGH (ibridazione genomica comparativa basata sugli array) ad alta risoluzione di oligonucleotidi per valutare le alterazioni del numero di copie nell'OSA canino e paragonare i dati direttamente con i casi di OSA umani. Anche in questo lavoro gli autori hanno identificato alterazioni genetiche conservate comuni tra le due specie. Lo studio ha permesso infatti di identificare diverse microaberrazioni genetiche con lunghezza minore di 500 Kb e quindi di geni ortologhi mutati associati all'OSA; lo studio ha dunque riconfermato la forte instabilità genomica tipica dell'OSA in entrambe le specie e la presenza di mutazioni su alcuni geni già precedentemente associata alla sua patogenesi

	cane	*uomo*
Incidenza	>10.000/anno	1000/anno
Età di insorgenza (picco)	7-9 anni	10-14 anni
Razza	Razze grandi o giganti	Nessuna differenza
Sito	77% scheletro appendicolare	90% scheletro appendicolare
	Metafisi ossa lunghe	Metafisi ossa lunghe
	Radio distale > omero prossimale > femore distale	Femore distale > tibia prossimale > omero prossimale
Eziologia	Generalmente sconosciuta	Generalmente sconosciuta
Segni clinici	Rigonfiamento / zoppia arto colpito	Dolore / rigonfiamento arto colpito
Principali sedi di metastasi	Polmone, osso	Polmone, osso
Fattori prognostici	Presenza di metastasi	Presenza di metastasi
	Livelli sierici AP	Livelli sierici AP
	Grandi dimensioni del tumore	Grandi dimensioni del tumore
	% necrosi tumorale	% necrosi tumorale
		Mancata risposta alla chemioterapia
Diagnosi (gold standard)	Biopsia / ago aspirato	Biopsia
Trattamento	Chirurgia e chemioterapia	Chirurgia e chemioterapia

Tab. 1. Osteosarcoma canino e umano a confronto

quali *RUNX2*, regolante il differenziamento degli osteoblasti, *CDC5l* e *c-MYC*, fattori di trascrizione che regolano l'espressione di diversi geni legati soprattutto alla proliferazione cellulare. Tra i geni mutati overespressi sono stati identificati anche *ADAM15,* che codifica una proteina transmembrana implicata nella proteolisi e nell'adesione cellulare, *CTC*, che mantiene stabile la forza di replicazione in condizioni di stress replicativo, e *TERT*, anche questo legato alla divisione cellulare. La maggior parte delle microaberrazioni descritte da Angstadt e collaboratori determina la perdita di funzione di diversi geni coinvolti soprattutto nella sintesi della subunità grande ribosomiale, nella modificazione istonica, nella trascrizione dell'mRNA, nella regolazione del complesso proteine-DNA, nell'attività delle chinasi dipendenti dalle cicline, nella divisione cellulare e nel differenziamento osteogenico: tra questi l'oncosoppressore *MEN1, CDK7* e anche *CDKN2a* e *CDKN2b*, che codificano per chinasi regolanti la divisione cellulare comunemente downregolate in diversi tumori canini e umani

(Angstadt *et al*., 2012).

La presenza di mutazioni sui geni *CDKN2*a e *CDKN2b* è stata riconfermata anche successivamente in uno studio di Karlsson *et al*. dove è stato valutato il profilo genetico di 492 cani appartenenti a 3 razze con elevata predisposizione all'insorgenza di OSA (Greyhounds, Rottweilers e Irish Wolfhounds) tramite GWAS (studi di associazione dell'intero genoma), utile a determinare le differenze genetiche tra individui della stessa specie. Lo studio ha messo in luce la presenza di 33 loci a rischio, le cui varie combinazioni determinano i differenti fenotipi della malattia; la regione genica maggiormente mutata, soprattutto tra i levrieri, è proprio quella regolante i geni *CDKN2*a e *CDKN2b* (Karlsson *et al*., 2013).

GWAS sull'OSA umano in una coorte di 941 pazienti ha invece permesso l'identificazione di mutazioni ricorrenti soprattutto nel gene *GMR4*, coinvolto nella trasmissione dei segnali intracellulari e nell'inibizione della cascata di segnale dell'AMP ciclico; diversi SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) sono presenti in regioni vicine al gene *GMR4* anche nella specie canina e in particolare nei Rottweilers (Schiffman *et al*., 2015).

Oltre ad approfondire la conoscenza sull'eziopatogenesi, le nuove tecniche genomiche forniscono anche i mezzi per la valutazione diagnostica e prognostica della malattia. Scott *et al*. (2011) si proposero di identificare un pattern di espressione genica che permettesse di distinguere i differenti sottotipi molecolari di OSA attraverso la valutazione dei profili d'espressione di una coorte di razze di cane predisposte all'insorgenza dell'OSA, sfruttandone la maggiore vastità di casi, l'eterogeneità genetica della razza canina e la rapida progressione del tumore, utile ad associare il profilo genetico alla prognosi. I risultati hanno permesso di dividere i casi in due sottogruppi distinti: il primo, a cui appartengono quelli con prognosi infausta, è caratterizzato dalla presenza di mutazioni su geni associati al *checkpoint* di transizione G2/M e del danno al DNA quindi alla mitosi, alla segregazione dei cromosomi e alla formazione del fuso mitotico; il secondo, associato ai tumori meno aggressivi, è caratterizzato invece dalla presenza di mutazioni su geni legati all'interazione con il microambiente quindi alla migrazione cellulare, all'adesione e all'angiogenesi. Inoltre, paragonando i dati ottenuti nel cane con i database disponibili nell'uomo, sono stati riscontrati gli stessi sottotipi con uguale andamento prognostico, suggerendo che lo studio dell'OSA canino può fornire informazioni sull'aggressività del tumore in entrambe le specie (Scott *et al*., 2011). La comparazione diretta tra tumori umani e canini contribuisce anche all'individuazione di target terapeutici comuni che pongono le basi per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Diverse sono le proteine, alcune codificate dai geni sopracitati, la cui espressione alterata è stata osservata sia nell'OSA umano sia in quello canino, e che sono bersaglio dei chemioterapici sviluppatisi negli ultimi anni. "Nutlin-3", per esempio, provoca morte cellulare sia nelle colture umane che canine funzionando come antagonista della proteina MDM2 ("*mouse double minute* 2"), un'ubiquitina ligasi che inibisce l'espressione della P53 e la degrada; altre proteine come RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa B*) e PDGFRβ (*Platelet-derived growth factor receptor β*) sono overespresse negli OSA di entrambe le specie e sono già bersaglio di anticorpi monoclonali in fase preclinica di studio. Potenziale target terapeutico è rappresentato anche dalla proteina AKT (proteina chinasica serina/treonina specifica), poiché induce l'espressione di MDM2 ed è attivata da HGFR (*hepatocyte growth factor receptor*), IGFR1 (*insulin-like growth factor receptor 1*) e c-Src, anche questi overespressi nell'OSA di entrambe le specie (Maniscalco *et al*., 2014). Ancora, la proteina STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3)*, che regola la proliferazione sia delle cellule di OSA umano sia canino, è bersaglio di un inibitore sintetico, LLL12, che potrebbe essere sottoposto a test anche nel cane.

Altri *pathways* molecolari che favoriscono lo sviluppo tumorale sono quelli coinvolti nell'ipossia e nell'angiogenesi, e rappresentano anche dei target terapeutici comuni, poiché

overespressi nelle cellule di OSA sia umano sia canino. VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) è uno dei principali attori dello stimolo angiogenico, la cui espressione è correlata con la malignità e la prognosi infausta in entrambe le specie; a oggi, diversi farmaci, composti da molecole sintetiche o anticorpi monoclonali accoppiati con la chemioterapia standard, che sono sottoposti a trials clinici, determinano l'inibizione di VEGF e quella di fattori a esso legati quali VEGFR (*Vascular endothelial growth factor receptor*), HIF1α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), HSP90 (*Heat shock protein* 90) che mantiene il folding proteico di questa e altre proteine overespresse negli OSA, e MT1-MMP (*membrane type-1 matrix metalloproteinase*) che ha un ruolo cruciale nell'angiogenesi e forma complessi con c-Src e VEGFR2 regolanti sia la migrazione cellulare sia la produzione di VEGF, e inoltre attiva mTOR (bersaglio della Rapamicina nei mammiferi), fattore molto discusso in oncologia poiché regolatore dell'autofagia e quindi della sopravvivenza delle cellule tumorali in condizioni di stress. Inoltre, c-Src e mTOR attivano una proteina, la cui overespressione correla con la presenza di metastasi, chiamata ezrina (o villina 2), un mediatore della citochinesi legante recettori tirosin-chinasici, che stimola le RhoGTPasi, che a loro volta regolano la F-actina. Gli inibitori del *pathway* mediato dalle RhoGTPasi, come gli inibitori di ROCK (proteine chinasi associate a Rho), sono anche questi in corso di studi preclinici in medicina umana (Rankin *et al*., 2012).

In conclusione, gli studi sul cane possono facilitare lo sviluppo della conoscenza molecolare e del trattamento dell'OSA umano soprattutto per la rapida progressione della malattia, ma considerata la vastità dei dati disponibili in letteratura sarebbe necessaria un'integrazione degli stessi per una più facile correlazione con i risultati clinici, così come nel recente progetto TARGET (*Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*) del NCI (*National Cancer Institute*), che ha lo scopo di integrare i dati derivanti dalle analisi genomiche relativi alla presenza di mutazioni, all'espressione genica e alle modificazioni epigenetiche nei tumori in modo da facilitare l'identificazione di molecole target e applicarle alla clinica (Isakoff *et al*., 2015).

Bibliografia

– Angstadt AY, Thayanithy V, Subramanian S, Modiano JF, Breen M. (2012) A genome-

wide approach to comparative oncology: high-resolution oligonucleotide aCGH of canine and human osteosarcoma pinpoints shared microaberrations. Cancer Genet 205:572-587.
– Boerman I, Selvarajah GT, Nielen M, Kirpensteijn J. (2012) Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma- a meta-analysis. BMC Vet Res 8:56.
– Boston SE, Ehrhart NP, Dernell WS, Lafferty M, Withrow SJ. (2006) Evaluation of survival time in dogs with stage III osteosarcoma that undergo treatment: 90 cases (1985-2004). J Am Vet Med Assoc 228:1905-1908.
– Ehrhart NP, Ryan SD, Fan TM (2013) Tumors of the skeletal system. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL, eds. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th ed. St. Louis, MI: Saunders Elsevier, p 463–503.
– Fenger JM, London Cheryl A, Kisseberth WC. (2014) Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. ILAR Journal 55:69-85.
– Fowles JS, Brown KC, Hess AM, Duval DL, Gustafson DL. (2016) Intra- and interspecies gene expression models for predicting drug response in canine osteosarcoma. BMC Bioinformatics 17:93.
– Karlsson EK, Sigurdsson S, Ivansson E, et al. (2013) Genome-wide analyses implicate 33 loci in heritable dog osteosarcoma, including regulatory variants near CDKN2A/B. Genome Biol 14:R132.
– Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E. (2002) Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. Vet Pathol 39:240-246.
– Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. (2015) Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. J Clin Oncol 33:3029-3035.
– Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature 438:803–819.
– Longhi A, Pasini A, Cicognani A, Baronio F, Pellacani A, Baldini N, Bacci G. (2005) Height as a risk factor for osteosarcoma. J Pediatr Hematol Oncol 27:314–318.
– Maniscalco L, Iussich S, Morello E, Martano M, Gattino F, Miretti S, Biolatti B, Accornero P, Martignani E, Sánchez-Céspedes R, Buracco P, De Maria R. (2015) Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with worse survival in canine appendicular osteosarcoma. Vet J 205:272-280.
– Misdorp W, Hart AA. (1979) Some prognosic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. J Natl Cancer Inst 62:537-545.
– Morello E, Martano M, Buracco P. (2011) Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma.Vet J.189:268-277.
– Ottaviani G, Jaffe N. (2009) The epidemiology of osteosarcoma. The etiology of osteosarcoma. In: Jaffe N, Bruland OS, Bielack S, eds. Pediatric and Adolescent Osteosarcoma, Cancer Treatment and Research, 152nd vol. New York: Sprinter, p 3–32.
– Paoloni M, Davis S, Lana S, Withrow S, Sangiorgi L, Picci P, Hewitt S, Triche T, Meltzer P, Khanna C. (2009) Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression. BMC Genomics 10:625.
– Powers BE. (1999) Current trends in oncologic pathology. Proc Am Coll Vet Intern Med Forum 17:356-358.
– Rankin KS, Starkey M, Lunec J, Gerrand CH, Murphy S, Biswas S. (2012) Of dogs and men: comparative biology as a tool for the discovery of novel biomarkers and drug development targets in osteosarcoma. Pediatr Blood Cancer 58:327-333.
– Schiffman JD, Breen M. (2015) Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 370(1673).
– Scott MC, Sarver AL, Gavin KJ, Thayanithy V, Getzy DM, Newman RA, Cutter GR, Lindblad-

Toh K, Kisseberth WC, Hunter LE, Subramanian S, Breen M, Modiano JF. (2011) Molecular subtypes of osteosarcoma identified by reducing tumor heterogeneity through an interspecies comparative approach. Bone 49:356-367.
– Slayter MV, Boosinger TR, Pool RR, Dammrich K, Misdorp W, Larsen S. (1994) Histological classification of bone and joint, Tumors of domestic animals, 2nd ed. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; Vol 1, p 5-45.
– Thompson KG, Pool RR. (2002) Tumors of bone. In: Tumors in domestic animals, ed. DJ Meuten, 4 th ed. Iowa State press; p 245-255.
– Thompson K. (2007) Bones and joints. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animal, 5th ed. Elsevier, Edinburgh, Vol. 1, p 112-118.
– Wei BR, Michael HT, Halsey CH, Peer CJ, Adhikari A, Dwyer JE, Hoover SB, El Meskini R, Kozlov S, Weaver Ohler Z, Figg WD, Merlino G, Simpson RM. (2016) Synergistic targeted inhibition of MEK and dual PI3K/mTOR diminishes viability and inhibits tumor growth of canine melanoma underscoring its utility as a preclinical model for human mucosal Pigment Cell Melanoma Res Jul 27.
– Withrow SJ, Wilkins RM. (2010) Cross talk from pets to people: translational osteosarcoma treatments. ILAR Journal 51:208-213.

PATOLOGIE PRE-NEOPLASTICHE E NEOPLASTICHE DELLA PROSTATA CANINA: VALIDO MODELLO PER IL CARCINOMA PROSTATICO ORMONO-RESISTENTE DELL'UOMO

LEONARDO DELLA SALDA, VITTORIA DI DOMENICO

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Teramo

Le patologie proliferative epiteliali prostatiche nel cane sono relativamente rare, a eccezione di alcune forme iperplastiche, tuttavia è possibile che siano sotto-diagnosticate dato che spesso decorrono in forma asintomatica. Ciò nonostante, il cane è considerato il miglior modello per lo studio di patologie pre-neoplastiche e neoplasiche prostatiche umane, poiché esibisce analogie anatomiche, fisiologiche e la presentazione spontanea delle stesse patologie, quali l'iperplasia prostatica benigna (BPH), la neoplasia intraepiteliale prostatica di alto grado (HGPIN) e il carcinoma, analogo alla forma ormono-resistente dell'uomo (Smith, 2008; LeRoy e Northrup, 2009; Argyle, 2009).

L'iperplasia prostatica benigna (BPH) è un'evoluzione spontanea indotta da fattori ormonali, correlata nel cane (e nell'uomo) all'avanzare dell'età, in cui si verifica iperplasia diffusa, e in minor misura ipertrofia, della ghiandola fino ad arrivare a un volume della stessa negli animali colpiti dai 2 alle 6,5 volte quello dell'organo di animali normali dello stesso peso e razza.

Il 16% dei cani presenta già a 2-3 anni d'età ipertrofia e iperplasia delle cellule prostatiche, interessa il 60% dei cani che ha superato i 5 anni d'età, fino a coinvolgere l'80-100% dei cani d'età superiore ai 10 anni. BPH è rara negli uomini sotto i 30 anni, ma è presente in circa il 50% degli uomini di 60 anni di età o superiore.

Tra le due specie uomo e cane, essa manifesta caratteri istologici differenti. Nell'uomo, infatti, si ha maggiore interessamento della zona si transizione, con espansione nodulare delle strutture ghiandolari e/o stromali. Nel cane invece si presentano due pattern istologici differenti. Nei soggetti sopra i 4 anni la patologia si mostra come una proliferazione papillare dell'epitelio secretorio intra-alveolare (iperplasia adenomatosa papillare dendritica o semplice), causata dall'aumento di volume e di numero delle cellule cuboidali dell'epitelio, specie a carico della zona periuretrale, che di conseguenza si solleva in pliche; mentre in quelli sopra i 6 anni si presenta come un'iperplasia ghiandolare diffusa o complessa, con alveoli atrofici o marcatamente dilatati che si affiancano a zone d'iperplasia ghiandolare associata all'incremento della componente stromale, in particolare della muscolatura liscia, talvolta con processi concomitanti quali cisti o infiltrati infiammatori cronici (fig. 1) (LeRoy e Northrup, 2009).

L'eziopatogenesi della BPH non è tuttora ben definita ma sicuramente è coinvolto uno squilibrio nel rapporto androgeni/ estrogeni prodotti dal testicolo (Smith, 2008). Diminuiscono infatti, con l'età, i livelli di testosterone e DHT circolanti, mentre si mantiene invariata la produzione di estrogeni.

Le neoplasie prostatiche rappresentano nel cane il 5-7% delle patologie prostatiche, con un'età media di 10 anni al momento della diagnosi, ovvero tra i 5 e i 17 anni (Cornell *et al*., 2000). Colpisce più frequentemente i cani orchiectomizzati (Smith, 2008; LeRoy e Northrup 2009), con un rischio di questi maggiore di 2,38 volte rispetto i cani interi. Più frequentemente si riscontra l'adenocarcinoma (o carcinoma - PC), con percentuale variabile tra lo 0,6 e il 16% a seconda degli autori. Meno frequenti sono invece il tumore a cellule di transizione (Smith, 2008). Il carcinoma prostatico nei cani è altamente aggressivo, caratterizzato da un

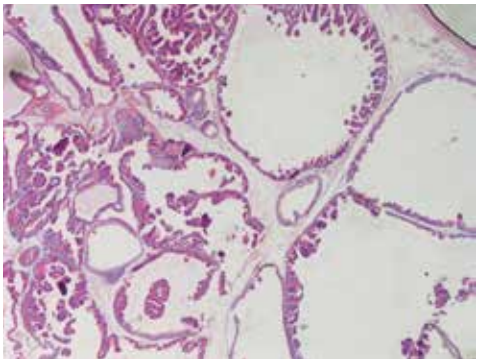


Fig. 1. Cane. Prostata. Iperplasia prostatica benigna (colorazione Ematossilina-Eosina; medio ingr.)

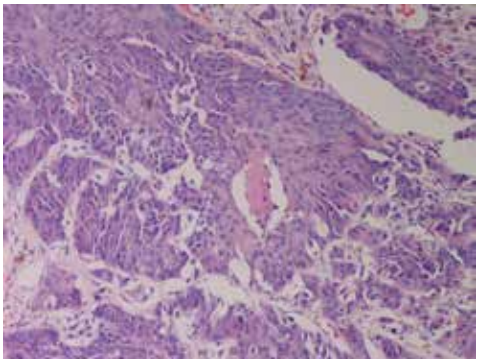


Fig. 2. Cane. Prostata. Carcinoma prostatico (colorazione Ematossilina-Eosina; medio ingr.)

alto tasso di metastasi alla presentazione (Cornell *et al*., 2000). La prognosi è generalmente infausta dato che non vengono sottoposti a terapia farmacologica o alla resezione chirurgica, che in genere determina incontinenza urinaria. Il cancro prostatico umano invece è il tumore più frequentemente diagnosticato ed è la seconda causa di cancro mortale nell'uomo occidentale (Varaala *et al*., 2016).

L'incidenza aumenta con l'età e più del 70% dei pazienti con PC hanno più di 65 anni. La prevalenza del cancro prostatico rispetto al cane è più alta (Cornell *et al* .2000; LerRoy e Northrup 2009) così come nel cane l'incidenza è decisamente inferiore (0,2–2,1%) ma tale dato potrebbe essere sottostimato a seguito della assenza nel cane di test rapidi e accurati che permettano di identificare stadi precoci della neoplasia. Nell'uomo, diversamente, è possibile utilizzare il test d'immunoreattività nei confronti del PSA, mentre nella specie canina non vi sono riscontri che gli anticorpi anti-PSA umani leghino una molecola simile espressa dal tessuto prostatico. Un marker che possa essere utilizzato è l'arginina esterasi, che nell'uomo è un precoce marker di patologia neoplastica, tuttavia nel cane viene espressa non solo dalla prostata ma anche da altri tessuti del tratto urinario, perdendo il ruolo di unico marker specifico (LeRoy e Northrup, 2009).

Il tumore nell'uomo solitamente si presenta inizialmente microscopico, di basso grado, con una lenta progressione, in una forma androgeno-sensibile, in cui la terapia con ablazione androgenica conduce a buoni risultati con rapido e rilevabile miglioramento clinico, solo successivamente, con maggior frequenza dopo 2-3 anni, può recidivare in una forma androgeno-insensibile (Feldman e Feldman, 2001), molto più aggressiva, con un alto potere metastatico e un quadro istologico più indifferenziato ed eterogeneo. Nel cane, diversamente dall'uomo, si sviluppa direttamente una forma neoplastica aggressiva, resistente agli androgeni, con una morfologia indifferenziata molto simile alla fase refrattaria del carcinoma prostatico umano (Lai *et al*., 2008), spesso con prognosi infausta dovuta alle metastasi che si sviluppano nel 70-80% dei casi.

Sia nel cane che nell'uomo si possono rilevare metastasi ossee osteoblastiche/osteolitiche, a prevalente localizzazione alla pelvi e/o a vertebre lombari, associate a dolore o deficit neurologici, o al polmone. Se ci sono metastasi ossee la stimolazione mediata da cellule prostatiche cancerose può indurre distruzione o generazione di nuovo osso, esercitare pressione sulle radici nervose o la corda spinale e/o esitare in fratture delle vertebre o della pelvi. Altri target

del processo metastatico possono essere la regione del collo, la vescica, il fegato, il colon e i muscoli pelvici, reni, milza e cervello. La presenza di tessuto neoplastico nella vescica urinaria è una manifestazione comune dell'invasività locale delle cellule neoplastiche, così come nello spazio perineurale e linfonodi regionali (Cornell *et al*., 2000), più raramente si ha linfoadenomegalia sistemica.

Lo sviluppo del PC è un processo multistep evidenziabile anche a livello istologico dalla presenza di diverse alterazioni, alcune prenoplastiche, che precedono lo sviluppo del tumore o che si rintracciano contestualmente a esso in entrambe le specie. Tra queste alterazioni la BPH, spesso presente anche in seno al tumore maligno, non viene considerata comunque un fattore di rischio nello sviluppo del cancro prostatico, mentre un ruolo diretto è dato dalla Neoplasia Intraepiteliale Prostatica di alto grado e dall'Atrofia Prostatica Infiammatoria.

L'Atrofia Prostatica Infiammatoria (PIA) è considerata un marker istologico precoce di carcinoma prostatico, ipotizzando che il cancro prostatico nell'uomo derivi da acini nella zona di transizione o periferica previamente affetti da prostatite infiammatoria. Successivamente, conseguentemente a un insulto infiammatorio cronico, le cellule epiteliali prostatiche circostanti sviluppano un cambiamento morfologico conosciuto appunto come atrofia prostatica infiammatoria (PIA) (Palapattu *et al*., 2005). La flogosi, a seguito della produzione di radicali liberi dell'ossigeno e radicali azotati, induce una spinta proliferativa sull'epitelio prostatico, con aumentato rischio di possibili errori a livello replicativo (rischio di mutazioni, riarrangiamenti genici). Le cellule infiammatorie inoltre rilasciano numerose citochine promotrici di proliferazione cellulare e neoangiogenesi (Strand e Goldstein, 2016).

E' un'ipotesi riconosciuta che la PIA possa dare origine a focolai di carcinoma prostatico (PC) direttamente o indirettamente attraverso la fase intermedia rappresentata da lesioni di neoplasia intraepiteliale di alto grado (HGPIN), tanto più che la zona di comparsa di PIA, HGPIN e PC sia la stessa o addirittura aree di HGPIN possano sorgere direttamente da lesioni atrofiche all'interno della stesso acino ghiandolare (Strand e Goldstein, 2016).

Le cellule nella PIA hanno un aspetto ridotto, in apparenza benigno, ma che presentano paradossalmente un incremento del tasso di divisione cellulare. Quadri di atrofia infiammatoria sono spesso visibili in prossimità dei foci di PIN e carcinoma, e le cellule solitamente contengono mutazioni presenti anche nella PIN che nel PC (LeRoy e Northrup, 2009). Complessivamente le lesioni di PIA appaiono come foci ipercromatici in una ghiandola apparentemente normale; gli acini interessati sono delimitati almeno da due strati di cellule epiteliali, con cellule luminali cuboidali ipercromiche, con più ampio citoplasma basofilo o di colore chiaro rispetto a quello delle cellule basali, con anisocariosi, anisocitosi e nucleoli prominenti (Toledo *et al*., 2010). In alcune lesioni gli acini atrofici appaiono come un solo strato o con cellule epiteliali appiattite (Strand e Goldstein, 2016). La maggior parte delle lesioni di atrofia focale prostatica sono considerate quiescenti, mentre in alcuni casi tali lesioni atrofiche assumono un carattere proliferativo che si sviluppa "*de novo*" o come risposta rigenerativa derivante dal processo di sostituzione cellulare (Liavåg, 1968). La PIA è stata riportata con elevata frequenza nei campioni di tessuto prostatico umano, mentre nella specie canina è più raramente segnalata nelle pubblicazioni (Toledo *et al*., 2010; Palmieri *et al*., 2014a) sebbene sia verosimile che sia sotto-diagnosticata.

Lo stadio iniziale del carcinoma prostatico umano è caratterizzato da aspetti microscopici conosciuti come Neoplasia Intraepiteliale Prostatica (PIN) che si manifesta come una proliferazione intra-luminale dell'epitelio (senza quindi superamento delle membrane basali duttali o ghiandolari) con vari gradi di malignità (Humphrey, 2012), il più alto dei quali (High Grade PIN - HGPIN) è considerato il principale parametro predittivo istologico del carcinoma prostatico. Le lesioni PIN sono caratterizzate dalla presenza di foci di disorganizzata proliferazione di preesistenti dotti e acini, pleomorfismo cellulare da moderato a medio, con atipie

citologiche dei nuclei (come variazioni di dimensioni e forma) che appaiono da rotondi a ovali, ipercromici, talvolta con nucleoli piccoli e/o prominenti, presenza di macrofagi nel lume delle ghiandole affette, neo-angiogenesi e in alcuni casi aggregati linfocitari. Nell'HGPIN le cellule sono cellule secretorie molte delle quali fenotipicamente e biochimicamente con aspetti riferibili alla cellule staminali (ad esempio esprimono la p63) (Matzusaki *et al*., 2010). Vi sono diversi sottotipi istologici di PIN nell'uomo ("dal ciuffo", micropapillare, cribriforme e piatto), anche se non vi è nessuna correlazione tra questi e il valore prognostico (Humphrey, 2012). Nonostante la presenza di lesioni similari a HGPIN sia stata più volte individuata nella ghiandola prostatica del cane, anche con frequenza rilevante, il valore di questa come marker precoce del cancro, contrariamene all'uomo, non è ancora accertato, sebbene recenti lavori ne sottolineano il possibile ruolo (Palmieri *et al*., 2014b). La presenza di PIN di alto grado in cani con contemporaneo carcinoma è stato rilevato in percentuali variabili tra il 30 e il 72%, e lesioni di un grado precoce di PIN sono state osservate nel 55% dei cani anziani interi senza manifestazione clinica di carcinoma (Waters e Bostwick,1997).

I tumori maligni epiteliali della prostata, nell'uomo si presentano più sovente come masse di piccole dimensioni. Nel cane, macroscopicamente, l'aumento di volume della prostata è asimmetrico ed irregolare, e l'invasione neoplastica della capsula determina un'adesione della ghiandola agli organi adiacenti. Ciò non è tuttavia stato rilevato in tutte le neoplasie, mentre un aumento asimmetrico della superficie dell'organo è più frequentemente riportato nella BPH. In caso di coinvolgimento dei tessuti circostanti, il tumore, che si sviluppa dall'epitelio duttale o acinoso, invade la capsula prostatica e i tessuti vicini, accompagnato da plasmacellule e in minor misura linfociti, talvolta con aspetti solidi, con denso stroma costituito da fibre collagene e fibre muscolari. L'adenocarcinoma canino solitamente presenta un fenotipo luminale, originando sia nella zona periferica sia in quella di transizione da cellule secretorie degli acini prostatici, più raramente duttale.

Nell'uomo i patterns istologici dell'PC coprono un ampia gamma di aspetti (Humphrey, 2012) e molti di loro rivestono un ruolo importante per quanto riguarda specifiche caratteristiche clinico-patologiche e prognostiche. A tal fine i carcinomi umani sono ripartiti in riferimento alla classificazione di Gleason, che assegna diversi gradi (1–5) in base della differenziazione architettonica delle cellule cancerose. La classificazione Gleason recentemente modificata rispetto all'originaria si raffigura un predittore molto accurato di progressione tumorale ed esito clinico prognostico nell'uomo con PC (Epstein *et al*., 2016). Modelli di grading con finalità prognostica simili a quelli adottati nella scala Gleason o lo stessa (Palmieri e Grieco, 2015) sono stati sviluppati anche nel cancro prostatico canino, ma il loro significato e utilizzo non è ancora ben definito.

Anche il carcinoma prostatico canino mostra una grande eterogenicità per gli aspetti istopatologici e nel grado di differenziazione (fig. 2). Accanto alla classificazione tradizionalmente accettata, stilata dalla World Health Organization, che include l'adenocarcinoma (PC) con i sottotipi alveolare e acinare e il carcinoma poco differenziato, studi successivi hanno descritto sottotipi istologici addizionali o a morfologia mista, alla cui lettura si rimanda per la trattazione dettagliata dei singoli aspetti istologici (Cornell *et al*., 2000; Lai *et al*., 2008; Palmieri *et al*., 2014a). Secondo questi ultimi, l'adenocarcinoma può differenziarsi istologicamente in istotipi a proliferazione intra-alveolare, papillare, acinoso, sinciziale, poco differenziato, a cui si aggiungono il carcinoma delle cellule squamose poco differenziato, organoide (o a rosette), e ancora il carcinoma delle cellule di transizione (LeRoy e Northrup, 2009). Differenti studi su tumori prostatici canini evidenziano inoltre forme di carcinomi cribriformi, con o senza aree centrali di necrosi (comedonecrosi), piccoli acinosi/duttali, e indifferenziati o forme miste, le più frequenti, micropapillari, solidi, mucinosi e cellule ad "anello con castone" (Signet ring cell) (Palmieri *et al*., 2014a). Maggiormente rappresentate sono strutture pseudo-alveolari for-

temente distorte, con numerose cellule neoplastiche singole, ovali fino ad assumere una forma fusata, e a morfologia mista, con la presenza di diversi modelli di differenziazione istologica all'interno della stessa sezione tissutale (Cornell *et al*., 2000). I tumori dalla morfologia mista rappresentano una variante più aggressiva del carcinoma prostatico canino, così come evidenziato dall'incremento della frequenza di metastasi associato con questo tipo di crescita tumorale. Una differenziazione neuroendocrina (NED), secondaria a terapia di deprivazione androginica è frequente nelle varie fasi di cancro della prostata nell'uomo, in particolare nel PC resistente alla castrazione. La presenza di NED generalmente si associa a comportamento clinico più aggressivo e una prognosi sfavorevole. L'identificazione di neuropeptidi secreti dalle cellule NE e di percorsi proliferativi e anti-apoptotici diversi ha portato a focalizzare l'attenzione su obiettivi diagnostici specifici e opzioni terapeutiche per questo sottotipo di PC. Le evidenze emergenti suggeriscono che l'acquisizione di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e cellule staminali tumorali (CSC) sono associati con lo sviluppo di NED nel PC (Strand e Goldstein, 2016).

Riguardo agli aspetti di biologia molecolare e alla patogenesi del carcinoma prostatico nel cane e nell'uomo, a fronte di numerose analogie, non tutti i meccanismi che portano alla insorgenza e progressione maligna del tumore sono compresi. Rilevanti negli ultimi anni sono stati gli sforzi mirati a identificare all'interno della popolazione cellulare tumorale le cellule progenitrici, e in particolare le così dette CSCs, ovvero le cellule staminali cancerose. La presenza di cellule staminali androgeno indipendenti maligne è stata valutata avere un ruolo importante nell'evoluzione del cancro prostatico resistente alla castrazione. L'esistenza di una sottopopolazione di cellule tumorali con tali caratteristiche negli stadi precoci dello sviluppo del cancro prostatico potrebbe essere la causa del fallimento della terapia di ablazione androgenica che si verifica negli stadi più avanzati (Feldman e Feldman, 2001). Il modello tradizionale per la differenziazione epiteliale prostatica propone che le cellule staminali prostatiche risiedano nello strato basale e diano luogo a intermedi cellulari che, attraverso una trans-amplificazione cellulare, producono un alto numero di cellule luminali secretorie differenziate (Strand e Goldstein, 2016). Tale ipotesi fu supportata dall'identificazione di cellule con fenotipo intermedio che esprimono citocheratine specifiche luminali e/o basali, sia nella vita fetale che nell'adulto, e altri studi hanno individuato anche nella popolazione del PC cellule intermedie che coesprimono un fenotipo sia luminale che basale, suggerendo che tale tumore possa derivare anche da queste ultime. Ulteriori indagini dimostrarono invece che cellule basali e luminali possono rappresentare linee cellulari epiteliali separate, o che progenitori cellulari luminali e basali possano anche esistere e rispondere indipendente agli stimoli di crescita. Anche ricerche sul fenotipo delle cellule cancerose, la maggior parte delle quali esprimente citochine luminali (Okada *et al*., 1992), indirizzano verso l'ipotesi che il PC derivi da progenitori o cellule luminali mature, che attraverso una mutazione hanno acquisito la capacità di rigenerarsi. La teoria che il PC umano, specialmente la forme più aggressive, possa generarsi da una sotto-popolazione di cellule staminali prostatiche con un alto potenziale proliferativo, negative per il recettore per gli androgeni e con predominante espressione di citochine e geni (quali bcl-2, p63) associati alle cellule basali, è sostenuta ancora da diversi studi (vedi in Strand e Goldstein, 2016), ed è supportata dall'evidenza che topi knock-out per il marker basale p63 nascono senza prostata. In base a questa teoria si spiegherebbero anche gli aspetti relativi alla "transizione epitelio-mesenchimale" visibile in tali tumori anche nel cane (Lean *et al*., 2014). Secondo altri autori invece il cancro prostatico deriverebbe da cellule luminali altamente differenziate (Strand e Goldstein, 2016), poiché la maggior parte della popolazione delle cellule tumorali, nelle forme più comuni di cancro, esprimono markers specifici per le cellule luminali - citocheratine (CK) 8,18, AR, PSA, PAP- con una perdita di espressione dei marker delle cellule basali (come CK14, CK5, p63). Tuttavia sono anche oc-

casionalmente osservate cellule che esprimono markers esclusivamente basali, il ché ha ulteriormente suffragato l'ipotesi che il carcinoma prostatico possa derivare da un progenitore intermedio che abbia acquisito la capacità di autorigenerarsi. Anche nel cane si osserva una prevalenza di cellule di derivazione luminale, quantunque anche cellule basali e cellule con differenziazione intermedia (CK5+AR+CK8/18+) (Akter *et al*., 2015).

Mentre durante lo sviluppo e nell'omeostasi tessutale della prostata la funzione dei recettori per gli androgeni (AR) è di prezioso sostegno, nel decorso tumorale il compromesso signaling di questo recettore è il principale responsabile per la progressione del cancro negli esseri umani. Diversi dati preclinici e clinici hanno confermato che il passaggio dal canonico sistema endocrino-dipendente a un signaling degli androgeni intracrina è essenziale per la progressione del cancro della prostata verso la forma resistente ai classici trattamenti di privazione degli androgeni. Inoltre, durante tale progressione, AR subisce cambiamenti molecolari come l'iperespressione, mutazione, splicing alternativo, modificazioni post-traslazionali e interazioni con altri percorsi (signaling AR non classico).

L'analisi sulla progressione del ciclo cellulare dipendente da AR nelle cellule tumorali prostatiche dimostra che tale recettore è un regolatore fondamentale nella progressione dalla fase G1 a S; infatti gli androgeni inducono un accumulo di ciclica D1, promuovono l'assemblaggio di CDK4/CiclinaD1 e facilitano l'attivazione di CDK2. Questi eventi conducono alla fosforilazione di Rb, derepressione dell'espressione della Ciclina A e progressione del ciclo cellulare in fase S. Nell'uomo, così come nel cane, tali recettori sono riscontrati nella maggior parte delle cellule basali, che nel cane a differenza dell'uomo si presentano in strato discontinuo (Romanucci *et al*., 2014), epiteliali e stromali (Leav *et al*., 2001), ma nelle cellule basali mantengono tale espressione anche nella trasformazione neoplastica, seppur con il rilevamento anche di una percentuale di cellule negative, secondo quanto riportato da alcuni autori. Negli stadi precoci del cancro prostatico umano questi tumori sono fortemente dipendenti dagli androgeni come fattore di crescita, tant'è che la deprivazione androgenica rappresenta la principale terapia, con rapido e marcato miglioramento clinico. Questo evento, segnalato da un abbassamento del PSA a livello sierico, può essere tuttavia transitorio. La neoplasia infatti spesso può ripresentarsi, accompagnata da un nuovo aumento di PSA, detto "recidiva biochimica" (Feldman e Feldman, 2001), ma in una forma resistente agli ormoni o, più esattamente, si verifica una progressione del tumore associata a un alterato recupero della funzionalità di AR.

Nel cane la maggior parte delle cellule di tessuto prostatico normale mostra un'estesa e forte espressione dei AR a livello nucleare nelle cellule epiteliali e solo in una piccola percentuale di quelle stromali, che diventa assente o lieve, o si presenta parzialmente con distribuzione citoplasmatica, nei tessuti di animali castrati (Lai *et al*., 2009), mentre nei siti di PIN la distribuzione si fa eterogenea e meno marcata (Matsuzaki *et al*., 2010). Studi effettuati da Leav *et al*. (2001) mostrarono che i tumori maligni prostatici non esprimono recettori per gli androgeni. Contrariamente altri autori (Gallardo *et al*., 2007; Romanucci *et al*, 2014) riportano l'espressione di tali recettori in tessuti prostatici cancerosi canini, seppur con una minore intensità rispetto a tessuti normali, con una distribuzione a livello citoplasmatico più che nucleare. La localizzazione citoplasmatica nelle cellule tumorali, dovuta ad una mutazione del AR che non gli permette di legarsi al nucleo, oppure a livello dell'esone 3 (Lai *et al*., 2009), denoterebbe che questo tumore possa derivare da cellule epiteliali basali/staminali esprimenti bassi livelli di AR. L'espressione citoplasmatica di AR in casi androgeno-indipendenti è ritenuto un fattore predittivo indipendente di recidiva biochimica dopo prostatectomia radicale nell'uomo.

Cellule di tumori insensibili agli ormoni possono adattarsi alla perdita di androgeni testicolari utilizzando androgeni prodotti dall'attivazione intra-prostatica di ormoni steroidei o

rilasciati a seguito ad altri fattori di crescita. Ricordiamo a tal proposito che le cellule neoplastiche prostatiche dell'uomo e del cane, a differenza dei tessuti normali, sono in grado di esprimere diversi fattori angiogenici (quali PECAM-1, VEGF e Tie-2) e possono aumentare la proliferazione tumorale.

Gli estrogeni sono fondamentali per la crescita e la differenziazione della ghiandola prostatica, essendo implicati nell'interazione stroma-epitelio, nell'uomo e in altre specie. Nell'uomo la perdita di espressione del recettore ERβ, fortemente espresso dalle cellule epiteliali luminali ma solo leggermente da quelle basali, è correlata con la progressione del normale epitelio prostatico verso una forma carcinomatosa (Gallardo *et al*., 2007).

La loro distribuzione nelle cellule cancerose canine è risultata contrastante nei diversi studi. Per Shulze e Barrack (1987) i recettori per gli estrogeni (ERs) si trovano solo a livello stromale, mentre per Grieco *et al*., (2006) hanno diversa espressione, rintracciandoli anche a livello di cellule luminali e con perdita di espressione rispetto alla ghiandola normale o iperplastica. Risultati simili sono riportati sempre nel cane da Gallardo *et al*., (2007), dove sembrerebbe che tale riduzione è più evidente rispetto a quella umana.

I ERs hanno normalmente una localizzazione a livello nucleare; nelle forme neoplastiche del cane si ha un'eterogenea distribuzione di questi recettori che, seppure localizzati a livello nucleare e riscontrati in una percentuale minore di cellule rispetto ai tessuti normali, si presentano distribuiti differentemente nei diversi istotipi di carcinomi senza tuttavia nessuna correlazione tra la tipologia o il grado tumorale e la distribuzione recettoriale secondo Gallardo *et al*. (2007). Nelle forme molto indifferenziate prevalgono a livello di un polo nucleare e la loro più bassa espressione rispetto alla controparte umana sostiene la tesi di Grieco *et al*. (2006) secondo cui il carcinoma prostatico canino è molto meno differenziato rispetto a quello umano.

Altre molecole implicate nel carcinoma prostatico sono la P53 ed Rb. Una sovra-espressione della proteina p53 è stata spesso osservata nel carcinoma prostatico umano e mutazioni nel gene p53 sono associati con la progressione del PC, scarsa differenziazione, metastasi e crescita androgeno-indipendente e, quindi, rappresenta un fattore prognostico negativo. La perdita della funzione di Rb a causa della perdita allelica (perdita di eterozigosi) è stato riscontrato nel 25- 50% dei casi di PC umani, ed è associata a recidiva e ridotta sopravvivenza libera da progressione dopo prostatectomia. Dati recenti suggeriscono che le alterazioni di p53, piuttosto che Rb, possono essere associate alla crescita maligna del tumore della prostata canino (Pagliarone *et al*. 2016).

Sussiste controversia riguardo l'associazione tra prostatite e cancro alla prostata. Come sopra affermato, nell'uomo le cellule che caratterizzano la PIA, possedendo alcune delle caratteristiche alterazioni del genoma trovate nel carcinoma della prostata e nell'HGPIN e pertanto considerate come "lesioni fattori di rischio" per lo sviluppo del PC, avvalorano un ruolo specifico dell'infiammazione cronica nell'eziologia del PC, tuttavia altri studi epidemiologici ridimensionano l'importanza dell'infiammazione (Vaarala *et al*., 2016). Nel cane, sebbene non si abbiano dati in tal senso e la frequente concomitante presenza di un quadro infiammatorio sembri essere a volte secondario, anche in questa specie aree di infiammazione cronica linfo-plasmacellulare sono comunemente associati con focolai di lesioni PIA.

Da quanto sopra descritto sono evidenti le fortissime analogie tra cane e uomo riguardo ai processi neoplastici che riguardano questa ghiandola, e ciò ha ovviamente intensificato l'utilizzo della specie canina quale modello di studio, non solo per meglio chiarire i meccanismi responsabili della loro insorgenza e progressione, ma soprattutto allo scopo di individuare nuove strategie terapeutiche rivolte contro bersagli molecolari cruciali per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule, specialmente le CSCs, o che alterino il microambiente in cui queste crescono.

Bibliografia

- Akter SH, Lean FZ, Lu J, Grieco V, Palmieri C. Different Growth Patterns of Canine Prostatic Carcinoma Suggests Different Models of Tumor-Initiating Cells. Vet Pathol. 2015 Nov;52(6):1027-33.
- Argyle DJ. Prostate cancer in dogs and men: a unique opportunity to study the disease. The Veterinary Journal 2009, 180: 137–138.
- Cornell KK, Bostwick DG, Cooley DM, Hall G, Harvey HJ, Hendrick MJ, Pauli BU, Render JA, Stoica G, Sweet DC, Waters DJ. Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. Prostate. 2000 Oct 1;45(2):173-83.
- Epstein JI.Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee. Collabrators (76) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns amd Proposal for a New Grading System. Am J Surg Pathol. 2016 Feb; 40(2):244-52
- Feldman BJ and Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer Nat Rev Cancer. 2001, 1, 23 – 45.
- Gallardo F, Mogas T, Barò T, Rabanal R, Morote J, Abal M, Reventòs J, Lloreta J. Expression of Androgen, Oestrogen alpha and beta, and Progesterone Receptors in the Canine Prostate: Differences between Normal, Inflamed, Hyperplastic and Neoplastic Glands J. Comp. Path. 2007,Vol.136,1-8
- Grieco V, Riccardi E, Rondena M, Romussi S, Stefanello D, Finazzi M. The distribution of oestrogen receptors in normal, hyperplastic and neoplastic canine prostate, as demonstrated immunhistochemically. J Comp Pathol. 2006 Jul;135(1):11-6
- Humphrey, PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. Histopathology 2012, 60, 59–74
- Lai CL, van den Ham R, van Leenders G, van der Lugt J, Mol JA, Teske E. Histopathological and immunohistochemical characterization of canine prostate cancer. Prostate. 2008 Apr 1;68(5):477-88.
- Lai CL, van den Hama R, Mol J,Teske E. Immunostaining of the androgen receptor and sequence analysis of its DNA-binding domain in canine prostate cancer. The Veterinary Journal 2009;181: 256–260
- Lean F, Kontos ZXS, Palmieri C. Expression of b-catenin and Mesenchymal Markers in Canine Prostatic Hyperplasia and Carcinoma. J. Comp. Path. 2014, Vol. 150, 373-381
- Leav I, Schelling KH, Adams JY, Merk FB and Alroy J. Role of canine basal cells in postnatal prostatic development, induction of hyperplasia, and sex hormone-stimulated growth; and the ductal origin of carcinoma. The Prostate. 2001; 48: 210–224.
- LeRoy BE., Northrup N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. Vet J. 2009, 180: 149-162.
- Liavåg L. Atrophy and regeneration in the pathogenesis of prostatic carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand. 1968, 73: 338-350.
- Matsuzaki P, Cogliati B, Sanches DS, Chaible LM, Kimura KC. Silva TC. Real-Lima MA, Hernandez-Blazquez FJ, Laufer-Amorim R, Dagli M.LZ. Immunohistochemical Characterization of Canine Prostatic Intraepithelial Neoplasia J. Comp. Path. 2010, Vol. 142, 84 - 88
- Okada H, Tsubura A, Okamura A, Senzaki H, Naka Y, Komatz Y, Morii S. Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1992;421(2):157-61.
- Pagliarone S, Frattone L, Pirocchi V, Della Salda L, Palmieri C. Altered expression of p53, but not Rb, is involved in canine prostatic carcinogenesis. Res Vet Sci. 2016 Apr;105:195-9.
- Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. Carcinogenesis. 2005

Jul;26(7):1170-81.
– Palmieri C, Grieco V. Proposal of Glrason-like grading system of canine protate carcinoma in veterinari pathology practice. Res Vet Sci 2015;103:11-5
– Palmieri C, Lean FZ, Akter SH, Romussi S, Grieco V. A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: histopathological findings and classification. Res Vet Sci. 2014 (a) Dec;97(3):568-73.
– Palmieri C, Mancini M, Benazzi C, Della Salda L. Heat shock protein 90 is associated with hyperplasia and neoplastic transformation of canine prostatic epithelial cells. J Comp Pathol. 2014 (b) May;150(4):393-8.
– Romanucci M, Frattone L, Ciccarelli A, Bongiovanni L, Malatesta D, Benazzi C, Brachelente C, Della Salda L. Immunohistochemical expression of heat shock proteins, p63 and androgen receptor in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma in the dog. Vet Comp Oncol. 2014 Jul 25.
– Ruizeveld de Winter JAR, Janssen PJA, Sleddens HMEB et al. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. Am J Pathol. 1994, 144, 735-746.
– Schulze H, Barrack ER. Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the normal male and female canine urinary tract and prostate. Endocrinology. 1987, 121,1773-1783.
– Smith J: Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. Theriogenology. 2008, 70: 375-383.
– Strand DW, Goldstein AS. The many ways to make a luminal cell and a prostate cancer cell. Endocr Relat Cancer. 2015 Dec;22(6):T187-97.
– Toledo DC, Rodrigues Faleiro MB, Marcondes Pinto Rodrigues M, Di Santis GW, Laufer Amorim R et al. Caracterizacão histomorfologica da atrofia inflamatoria proliferativa na prostata canina. Ciëncia Rural, Santa Maria. 2010, 40, 1372-1377
– Vaarala MH, Mehik A, Ohtonen P, Hellström PA. Prostate cancer incidence in men with self-reported prostatitis after 15 years of follow-up. Oncol Lett. 2016 Aug;12(2):1149-1153.
– Waters DJ, Bostwick DG. Prostatoc intraepithelial neoplasia occurs sponteneously in the canine prostate. J Urol. 1997 Feb; 157(2):713-6

LE NEOPLASIE MAMMARIE DEI CARNIVORI DOMESTICI: ANALOGIE CON IL MODELLO UMANO

ALESSANDRO POLI[1], FRANCESCA MILLANTA[1], VALENTINA ZAPPULLI[2], RAFFAELLA DE MARIA[3], MICHELA LEVI[4], GIUSEPPE SARLI[4]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Pisa;
[2] Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova;
[3] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino;
[4] Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna

Introduzione (caratteristiche generali, incidenza, fattori eziologici)

Le neoplasie mammarie, oggetto di segnalazioni occasionali negli animali da reddito, rappresentano invece una realtà oncologica di frequente riscontro nella pratica clinica veterinaria degli animali da compagnia quali cani e gatti. In particolare nei Paesi in cui la sterilizzazione precoce degli animali da compagnia non è pratica di routine, tali neoplasie raggiungono nel cane anche il 50-70% di tutte le forme tumorali (Moe, 2001). Nella specie felina l'incidenza si abbassa rispetto al cane, raggiungendo comunque valori pari a circa il 25% dei tumori nella gatta intera (Vascellari *et al*., 2009). Similmente alle specie domestiche, il cancro al seno rappresenta la neoplasia più frequente della donna. Non solo per questa elevata incidenza comune alle tre specie, i tumori mammari del cane e del gatto sono storicamente considerati come modelli animali spontanei del cancro al seno della donna (Zappulli *et al*., 2005; Pang e Argyle, 2009; Queiroga *et al*., 2011; Beauvais *et al*., 2012; Pinho *et al*., 2012).

Diversi sono i fattori di rischio direttamente associati allo sviluppo del tumore mammario che accomunano le tre specie. Tra i principali devono essere considerati: l'età, la stimolazione ormonale, la razza, la dieta e lo stato nutrizionale. Prevalentemente, il tumore della ghiandola mammaria è una neoplasia del paziente di età media-anziana, in cui un protratto stimolo ormonale estrogenico/progestinico, endogeno o esogeno, favorisce lo sviluppo della neoplasia. Per contro, una precoce interruzione di tale stimolo (sterilizzazione prima del primo-terzo calore negli animali) riduce il rischio di sviluppo del tumore (del 99,5-74% nel cane) (Kapil *et al*., 2014). Una certa predisposizione di razza è stata confermata nella donna e in parte anche nelle specie animali, cosi come un aumento del rischio di sviluppo tumorale in caso di dieta ad alto contenuto lipidico e proteico e di obesità (*Kapil et al*., 2014).

Morfologia, istologia e grading

Alcune caratteristiche morfologiche e istologiche confermano che entrambi i modelli, sia quello delle neoplasie mammarie della cagna sia quello della gatta, hanno aspetti in comune con il cancro al seno della donna. Tuttavia, non tutti i caratteri oggetto di analogia con la donna sono ugualmente rappresentati nelle due specie animali.

Nei diversi sistemi classificativi delle neoplasie mammarie nelle diverse specie (cane, gatto, uomo) sono considerate 3 categorie morfologiche:

1. displasie mammarie, che prevedono la presenza di lesioni non neoplastiche variamente associate tra di loro a caratterizzare quella che viene definita da alcuni autori come mastopatia fibrocistica, lesione di frequente riscontro nella evoluzione senile;
2. neoplasie benigne;
3. neoplasie maligne.

Nella cagna, il rapporto tra neoplasie benigne e maligne varia secondo lo studio considerato da 4:6 a 5:5, va tuttavia sottolineato che si riscontrano prevalentemente displasie e neoplasie benigne e, tra le neoplasie maligne, abbondano i c.d. carcinomi *in situ*, cioè quelli non infiltranti. Nella gatta invece il rapporto tra neoplasie benigne e maligne è nettamente spostato verso i tumori maligni (B:M=1:9) e, in questi ultimi, prevalgono nettamente i carcinomi infiltranti. Nella donna il carcinoma della mammella è strettamente età dipendente verificandosi raramente sotto i 40 anni (5% dei casi), mentre è più frequente dopo i 50 anni (Lakhani *et al*., 2012). Nella donna tra i 30 ed i 40 anni prevalgono tumori benigni (Lakhani *et al*., 2012). Tali dati sono in analogia con quanto noto per le neoplasie mammarie nella cagna, in cui prevalgono adenomi in soggetti sotto i 5 anni e carcinomi in quelli più vecchi di 5 anni.

Nei sistemi classificativi delle neoplasie mammarie in campo veterinario (Misdorp *et al*., 1999; Goldschmidt *et al*., 2011) ricorrono, nel cane, i termini di tumore semplice (fig. 1), tumore complesso (fig. 2) e tumore misto (fig. 3). Tale dato non trova adeguata ripetizione in patologia umana. Il distretto duttulo-alveolare, considerato la sede più frequente di iniziale insorgenza del carcinoma mammario nel modello del cane e del gatto, possiede una struttura istologica costituita da un epitelio secernente, o luminale, e uno non secernente o abluminale o mioepiteliale. Si considerano semplici quelle neoplasie, benigne o maligne istogeneticamente riconducibili a una sola delle due componenti, mentre i tumori complessi sono quelli in cui, nelle proliferazioni benigne o maligne, coesistono entrambe le componenti. I tumori misti, termine ampiamente usato per quanto improprio (non si tratta di veri tumori misti o teratomi), prevedono, insieme alle due componenti dei tumori complessi, la presenza di una o più componenti mesenchimali (tessuto cartilagineo e osseo) originate molto probabilmente da metaplasia della componente mioepiteliale. Nella cagna, in modo pressoché unico rispetto alla gatta e alla donna, sono preponderanti gli adenomi e i carcinomi complessi, mentre nella gatta, in cui i tumori a doppia componente (complessi) sono oggetto di rare segnalazioni, prevalgono nettamente i tumori (maligni) semplici. Secondo diversi studi anche il tumore misto (dato come sottinteso benigno, in quanto composto da componenti tutte benigne) è uno dei più frequenti istotipi diagnosticati nella cagna, mentre è rarissimo nella gatta e nella donna.

Nella donna il distretto duttolo-alveolare (le c.d. *Terminal Duct Lobular Unit* (TDLU) (Lakhani *et al*., 2012) rappresenta, come negli animali, la più frequente sede di insorgenza del tumore al seno. Tuttavia nella specie umana prevale fortemente l'istotipo classificato come "*Invasive Breast Carcinoma of No Special Type* (NST)", terminologia coniata con la IV edizione del Bollettino WHO dei tumori mammari della donna, che sostituisce il termine precedentemente utilizzato di "*Invasive Ductal Carcinoma* (*No Otherwise Specified* - NOS) (Sinn e Kreipe, 2013). Dalla stessa sede originano le più rare neoplasie benigne (Lakhani *et al*., 2012). Nella donna sono rare le proliferazioni neoplastiche bifasiche con doppia componente di epitelio e mioepitelio quali l'adenoma pleomorfo (che comprende una proliferazione epiteliale benigna circondata da una componente mioepiteliale immersa in una matrice condroide e che assomiglia ai frequentissimi tumori misti benigni della cagna), l'adenomioepitelioma (in cui coesiste una duplice componente, epiteliale e mioepiteliale, la seconda che circonda la prima, come negli adenomi complessi della cagna) e il carcinoma adenoide cistico (caratterizzato da iperproduzione di componente mucopolisaccaridica e di membrana basale). Infrequenti sono anche quelle di solo mioepitelio come l'iperplasia mioepiteliale, la sferulosi collagena e il carcinoma mioepiteliale (quest'ultimo spesso evoluzione maligna di un adenomioepitelioma e analogo al mioepitelioma maligno, raramente diagnosticato nella cagna) (Tan e Hellis, 2016). Pertanto, in considerazione del fatto che nella donna prevalgono neoplasie (maligne) infiltranti composte dalla sola componente epiteliale, il modello di carcinoma mammario felino, su base morfologica, è un modello più adeguato rispetto a quello canino.

Il sistema classificativo delle neoplasie mammarie maligne della cagna e della gatta si

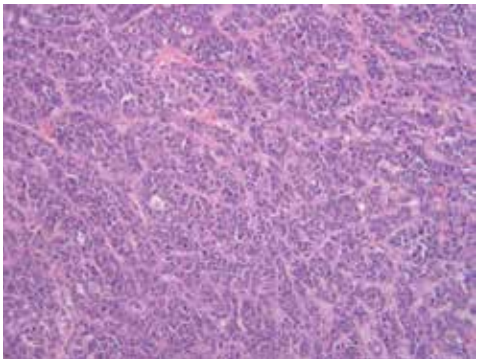


Fig.1. Gatto. Carcinoma solido semplice, caratterizzato da proliferazione neoplastica maligna di una sola componente (colorazione Ematossilina-Eosina; 20x)

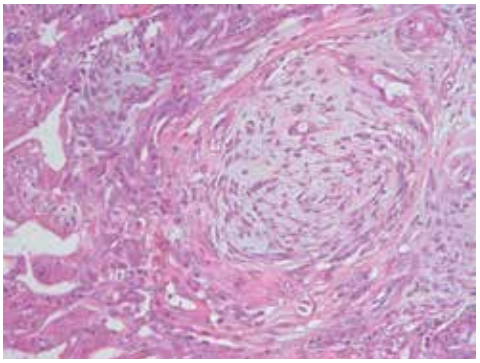


Fig. 2. Cane. Carcinoma complesso, caratterizzato da componente di epitelio luminale maligna a struttura tubulo papillare (parte bassa e sinistra della figura) e una componente mioepiteliale con cellule fusate immerse in matrice basofila (parte alta e destra dell'immagine) (colorazione Ematossilina-Eosina; 20x)

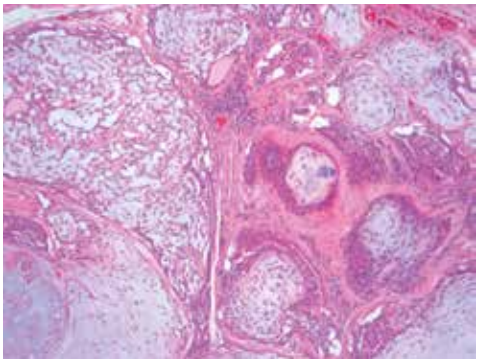


Fig. 3. Cane. Tumore misto benigno, caratterizzato da 3 componenti: parte epiteliale luminale benigna, componente mioepiteliale e aree di metaplasia cartilaginea (colorazione Ematossilina-Eosina; 10x)

è oggi arricchito anche di una oggettivizzazione fenotipica mutuata dalla patologia umana (fig. 4A) che aggiunge all'aspetto morfologico della neoplasia il fenotipo neoplastico in base all'espressione di recettori/marcatori che individuano 5 gruppi tumorali: luminal like A e B, HER-2 overexpressing, basal-like e normal like (fig. 4B). I carcinomi basal-like sono spesso inquadrati anche come "triplo-negativi" poiché negativi ai recettori estrogenico e progestinico e a HER-2. Tale sistema è nato in medicina umana con indagini di tipizzazione genetica, ma è oggi ampiamente diffuso il suo impiego mediante surrogati immunoistochimici che con un pannello di anticorpi documentano la presenza di antigeni secondo criteri di score ben

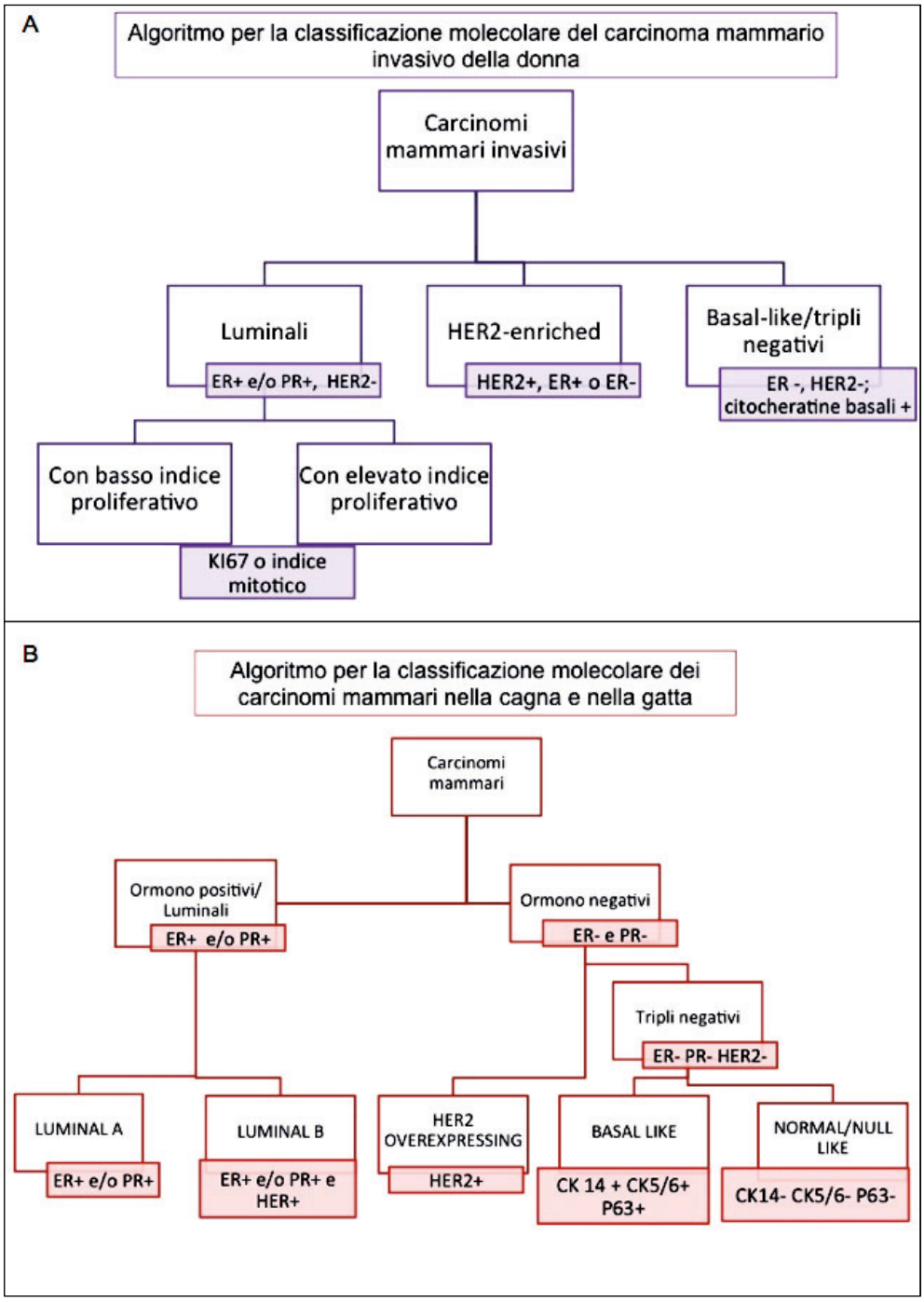


Fig. 4. Schema riassuntivo della classificazione in gruppi fenotipici del carcinoma del seno della donna (A) e dei carcinoma mammario del cane e del gatto (B).

definiti, per permettere la classificazione in uno dei 5 gruppi secondo lo schema di fig. 4B.

Indagini di fenotipizzazione delle neoplasie mammarie, ad oggi, sono più frequenti nella cagna rispetto alla gatta (fig. 4B). Tra le analogie riscontrabili con il modello umano vanno segnalate l'elevata frequenza e una evoluzione prognostica più benigna dei carcinomi luminal-like sia nella donna sia nella cagna, mentre il modello del gatto fa segnalare una maggior frequenza di carcinomi HER2 overexpressing e basal-like con comportamento più aggressivo come gli analoghi della donna. In medicina umana la forza della classificazione fenotipica risiede nella possibilità di individuare bersagli biologici alla base della moderna terapia molecolare delle neoplasie (terapia anti-ormonale nei luminal-like, anticorpi anti-HER2 nei luminal-like B e negli HER2-overexpressing), di cui si hanno iter terapeutici ormai consolidati e di provata efficacia. Tali approcci terapeutici non sono ancora disponibili in medicina veterinaria. Alla luce delle analogie fenotipiche individuate e sopra descritte, la cagna andrebbe vista come un buon modello per lo studio in oncologia comparata di neoplasie spontanee ormonosensibili, mentre la gatta per lo studio di carcinomi basal-like.

Sia in medicina umana sia in medicina veterinaria sono applicati sistemi di grading condivisi. Il più diffuso in medicina umana è quello proposto da Elston Ellis, noto anche come metodo Nottingham che produce come risultato finale il grado istologico e si applica solo ai carcinomi infiltranti. Esso prende in considerazione tre caratteristiche: differenziazione tubulo-ghiandolare, anaplasia nucleare e numero di mitosi, integrando le informazioni apportate da ogni parametro. Attribuisce quindi a ogni caratteristica un punteggio che, sommato a quello degli altri caratteri, esita in un totale che decide il grado finale (Tab. 1). Nella cagna è stato proposto un sistema di grading molto simile, che utilizza i medesimi parametri. Il metodo di valutazione e i punteggi attribuiti per il sistema del cane sono stati di recente rivisti per definire meglio l'interpretazione relativa all'eventuale presenza del mioepitelio (Peña *et al*., 2013) (Tab. 1). Nel gatto, è stato a lungo utilizzato un modello di grading di Elston Ellis modificato, scarsamente prognostico per il grado II. Di recente è stato pertanto proposto un sistema diverso che si è rivelato maggiormente associato alla prognosi (Tab. 1) (Mills *et al*., 2015).

Il grading è quindi un parametro di valutazione rivelatosi nelle tre specie significativamente valido ai fini prognostici, associato cioè a una prognosi peggiore con l'aumentare del grado. Differenze di specie nei modelli animali hanno richiesto importanti aggiustamenti e una robusta standardizzazione per raggiungere l'utilità prognostica.

Fattori ormonali

Gli ormoni ovarici giocano un ruolo importante nello sviluppo delle neoplasie dei carnivori domestici, così come nella progressione del carcinoma mammario della donna. Nel cane e gatto, il coinvolgimento degli ormoni steroidei nella progressione neoplastica delle neoplasie mammarie è dimostrato dall'effetto protettivo dell'ovariectomia effettuata precocemente, entro il primo calore (Hayden *et al*., 1989). Molte indagini hanno dimostrato come l'espressione dei recettori per estrogeno (ER) e per progesterone (PR) siano fattori prognostici importanti per la sopravvivenza delle due specie di carnivori così come nella donna (Ariazi *et al*. 2006; Millanta *et al*., 2006; Pinho *et al*., 2012).

In particolare, l'immunolocalizzazione di questi recettori ormonali in campioni di tessuto fissato in formalina ha permesso l'identificazione delle cellule positive attraverso l'osservazione dei nuclei specificamente colorati (Geraldes *et al*., 2000) (fig. 5). Negli anni sono state condotte molte indagini per valutare l'espressione dei recettori per estrogeno-alfa (ERalfa) e –beta (ERbeta) e per il recettore per il progesterone (PR) valutandone l'associazione con la progressione delle patologia neoplastica, lo stato clinico e il valore prognostico. In entrambe le specie sono state condotte sia in indagine retrospettive (Millanta *et al*., 2005 e 2006; Chang

Parametri da valutare	Donna (Sistema di Nottingham 1991)		Cagna (Peña et al., 2013)		Gatta (Mills et al., 2014)	
Formazione di tubuli	Abbondante >75% nel campione	→ score 1	Abbondante >7% nel campione	→ score 1	/	/
	Moderata 10-75% nel campione	→ score 2	Moderata 10-75% nel campione	→ score 2	/	/
	Minima o assente <10% nel campione	→ score 3	Minima o assente <10% nel campione	→ score 3	/	/
Pleomorfismo nucleare	Nuclei piccoli regolari e uniformi	→ score 1	Nuclei piccoli regolari e uniformi	→ score 1	/	/
	Moderata variazione in dimensione e forma	→ score 2	Moderata variazione in dimensione e forma	→ score 2	/	/
	Marcata variazione	→ score 3	Marcata variazione	→ score 3	/	/
Conta mitotica in 10 campi a forte ingrandimento (area di 2,37 mm^2)	<9 mitosi	→ score 1	<9 mitosi	→ score 1	≤62 mitosi	→ score 0
	10-19 mitosi	→ score 2	10 - 19 mitosi	→ score 2	>62 mitosi	→ score 1
	>20 mitosi	→ score 3		→ score 3	/	/
Forma del nucleo	/	/	/	/	≤5% anormale	→ score 0
	/	/	/	/	>5% anormale	→ score 1
Invasione linfovascolare	/	/	/	/	assente	→ score 0
	/	/	/	/	presente	→ score 1
Score totale donna e cagna	Score totale gatta	Grado istologico				
da 3 a 5	0	I (Carcinoma di basso grado)				
da 6 a 7	1	II (Carcinoma di grado intermedio)				
da 8 a 9	da 2 a 3	III (Carcinoma di alto grado)				

Tab. 1. Sistemi di grading istologico dei carcinomi mammari attualmente in uso per la donna, la cagna e la gatta. Nella prima parte sono elencati i parametri di valutazione

et al., 2009) sia prospettive (Nieto *et al*., 2000; Martin de las Mulas 2005; Burrai *et al*., 2010) con risultati non sempre conclusivi, particolarmente per la specie canina.

Tutti gli autori concordano come nel cane l'espressione di ERalfa e PR risulti ridotta nelle forme maligne (Peña *et al*., 2014), ma la percentuali di cellule esprimenti i recettori varia nelle diverse indagini, soprattutto per le diverse metodiche immunoistochimiche impiegate (anticorpi primari e sistemi di rilevazione) e per i sistemi di quantificazione della positività. Nelle neoplasie mammarie benigne sono state riportate positività per ER variabili tra il 17% (Klopfleish *et al*., 2010) e il 100% (Yang *et al*., 2006), anche se in genere le forme benigne risultano caratterizzate da un'elevata espressione del recettore (Millanta *et al*., 2005; Chang *et al*., 2009; Morris *et al*., 2009). Le forme maligne sono risultate essere ERalfa+ in percentuale ridotta variabile tra il 10 -13% (Illera *et al*., 2006; Klopfleish *et al*., 2010;) e il 70-90% (Millanta *et al*., 2005; Yang *et al*., 2006). Per la presenza di carcinomi infiltranti ERalfa positivi, è stato ipotizzato che l'ovariectomia, effettuata al momento della rimozione della neoplasia, possa avere un effetto positivo sull'andamento post-operatorio di queste patologie neoplastiche (Kristiansen *et al*., 2016). A differenza di quanto avviene per il recettore ERalfa, il recettore ERbeta risulta essere espresso in maniera costante nelle forme sia benigne sia maligne in maniera indipendente dall'espressione di ERalfa e PR (Port Louis *et al*., 2012). Per quanto riguarda per l'espressione di PR, sono stati ottenuti risultati analoghi. Nelle diverse indagini la percentuale di adenomi mammari PR+ variava tra il 50% (Millanta *et al*., 2005), il 96% (Martin de las Mulas *et al*., 2005) e il 100% (Chang *et al*., 2009), mentre per i carcinomi era tra il 24% (Millanta *et al*., 2005), il 66% (Martin de las Mulas *et al*., 2005) e il 72%(Chang *et al*., 2009).

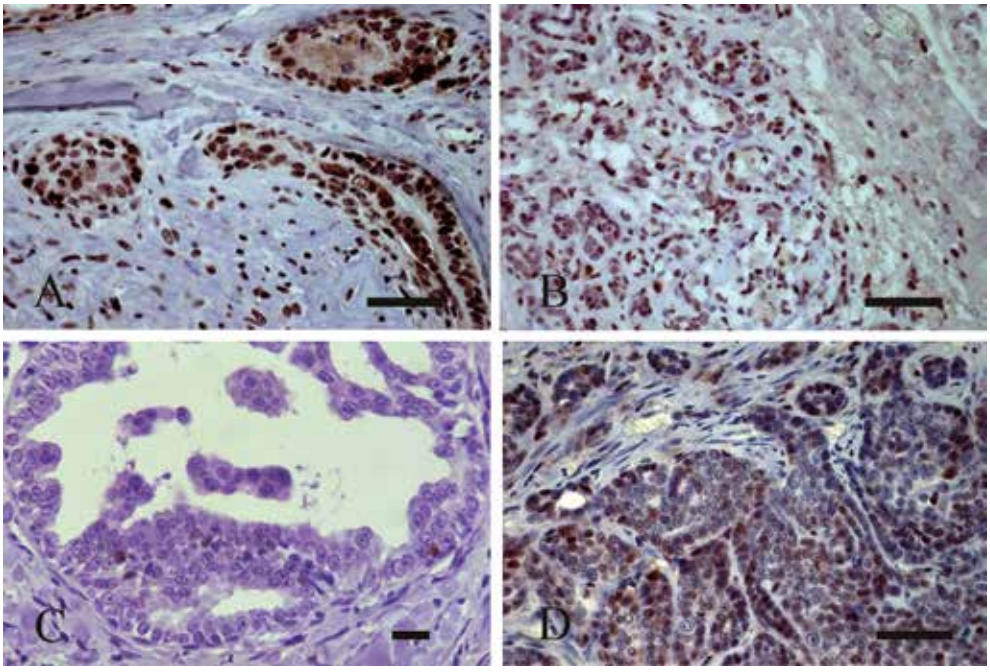


Fig. 5. Immunoistochimica dei recettori per estrogeno (ER) e progesterone (PR) nelle cellule neoplastiche mammarie nel cane (A,B) e nel gatto (C,D). (A) Carcinoma mammario complesso di cane ER-positivo. (B) Carcinoma mammario semplice di cane PR-positivo. (C) Carcinoma mammario di gatto ER-positivo. (D) Carcinoma mammario di gatto PR-positivo. Notare la positività nucleare delle cellule neoplastiche in tutti i tumori (anticorpi policlonali anti-PR e anti-ER; streptavidina-biotina per ossidasi; barra=100 μm).

Nella specie felina il tessuto mammario sano e le lesioni displastiche esprimono ERalfa, mentre la maggior parte delle lesioni maligne risulta ER-negative (Martin de las Mulas *et al*., 2000, Millanta *et al*., 2006), anche se in una recente indagine un'elevate percentuale di carcinomi mammari infiltranti è risultata ERalfa+ e PR+ (De campos *et al*., 2015). Un'elevata percentuale di forme di displasia e in particolare l'ipertrofia mammaria felina risultano PR positive, infatti è stato introdotto l'impiego di antiprogestinici come trattamento alternativo di questa patologia (Wehrend *et al*., 2001). In questa specie una percentuale variabile di carcinomi che può arrivare al 60% dei casi può risultare PR+ (Millanta *et al*., 2006). Nella specie felina anche l'espressione del mRNA per ERalfa è risultata significativamente ridotta nei carcinomi rispetto al tessuto non neoplastico (Caliari *et al*., 2014).

Nella donna ERalfa e PR hanno un ruolo chiave nello sviluppo delle neoplasie mammarie e in particolare ERalfa è da almeno 30 anni un bersaglio importante per la terapia di queste neoplasie. Il Tamoxifene è uno dei farmaci maggiormente utilizzati per le neoplasie mammarie della donna ER+, essendo in grado di inibire la proliferazione delle cellule neoplastiche (Ariazi *et al*., 2006). Per questo nella specie umana la soglia di positività per l'espressione di questi recettori è definita dalla percentuale di cellule ERalfa- e PR+ che assicuri l'efficienza

dell'ormonoterapia, e recentemente questa soglia è stata identificata nell'1%, perché pazienti con un numero di cellule così basso possono ancora rispondere alla terapia ormonale (Hammond *et al*. 2010).

In medicina veterinaria, questa soglia non è stata ancora individuata, anche per il mancato impiego di una terapia specifica, e questo in parte spiega la mancata standardizzazione delle procedure messe in atto nei diversi laboratori.

Anche i dati sul valore prognostico dell'espressione di questi recettori sono ancora contraddittori. Nella specie canina neoplasie mammarie maligne ERalfa+ hanno mostrato una prognosi favorevole in uno studio prospettico con analisi multivariata (Nieto *et al*., 2000), ma non in un'altra indagine (Martin de las Mulas, 2005), mentre l'espressione di PR è risultata essere associata ad una prognosi migliore in un'analisi retrospettiva univariata (Chang et al., 2009). Nella specie felina manca una correlazione chiara tra mancata espressione dei recettori per ERalfa e PR e evoluzione della malattia, anche se le neoplasie ERalfa-negative presentavano una prognosi peggiore (Millanta *et al*., 2006).

In conclusione, le numerose indagini condotte hanno consentito di evidenziare come in entrambe le specie si osservi una progressiva perdita dell'espressione del recettore ERalfa, con la progressione della malattia neoplastica, più evidente nei carcinomi mammari infiltranti felini. Sulla base di queste osservazioni si può ritenere che le neoplasie mammarie dei carnivori domestici possano essere considerate un modello interessante per le diverse forme del carcinoma mammario della donna. In particolare i carcinomi mammari canini per l'elevata percentuale di forme ERalfa+ e PR+ possono essere impiegati per le forme ormonodipendente della donna (Donnay *et al*., 1996; Vinothini *et al*., 2009), mentre quelli felini per le neoplasie ormono-indipendente (Martin de las Mulas, 2002; Millanta *et al*., 2006) o per le forme triplo-negative/basal-like (Calieri *et al*., 2010). Tali modelli possono essere utili per indagare i processi di cancerogenesi, sia per lo sviluppo di terapie innovative.

Caratteristiche molecolari

Studi molecolari eseguiti sul tumore mammario felino (FMC) e canino (CMC) hanno permesso di evidenziare come questi tumori presentino anche a livello molecolare omologie con il tumore mammario della donna. Tra i geni e le proteine maggiormente coinvolte nella patogenesi di questi tumori annoveriamo geni che codificano per recettori tirosina kinasici (RTKs), per trasduttori citoplasmatici, fattori di crescita, regolatori del ciclo cellulare e dell'apoptosi (Hughes *et al*, 2012).

Per quanto riguarda il FMC sono stati identificati i geni e le proteine che codificano rispettivamente per i RTKs HER2 e stk-RON, entrambi coinvolti come nella donna nella progressione del carcinoma mammario della donna. Tracciando invece i trasduttori del segnale, lavori recenti hanno riguardato principalmente la proteina kinasi AKT che nella sua forma fosforilata (p-AKT) rappresenta un fattore prognostico negativo e la fosfatasi PTEN la cui perdita di espressione è correlata a una prognosi negativa nel tumore mammario felino e rappresenta il regolatore negativo della kinasi p-AKT.

In relazione ai trasduttori appena citati e al fenotipo triplo negativo nel FMC, ulteriori studi hanno evidenziato come l'espressione delle proteine citoplasmatiche mTOR e p-mTOR è maggiore nel fenotipo triplo negativo, che nella donna è un tumore molto aggressivo che non risponde alle terapie ormonali e biologiche. Oltre al tumor suppressor PTEN appena citato, alcuni studi hanno evidenziato che TP53 è overespressa nei carcinomi felini a livello immunoistochimico rispetto alle lesioni benigne, sebbene esista solo un articolo che dimostri la presenza di mutazioni geniche di tale gene a carico delle regioni hot-spot (esone 4-esone 8).

Come nel carcinoma mammario della donna, anche nel FMC sono stati eseguiti studi

Geni e pathways molecolari	*Tumori mammari canini*	*Tumori mammari felini*	*Tumori mammari umani*
PI3K/AKT	Up-regulation	Up-regulation	Up-regulation
KRAS	Up-regulation	n.d.	Up-regulation
PTEN	Down-regualation	Down-regualation	Down-regualation
Wnt-b catenina	Up-regulation	n.d.	Up-regulation
MAPK	Up-regulation	n.d.	Up-regulation
BRCA1	Down-regulation	n.d.	Down-regualation
BRCA2	Up-regulation	n.d.	Up-regulation
TP53	Mutazione/ down-regulation	Mutazione/down-regulation	Mutazione/down-regulation
E-cadherin	Down-regualation	n.d.	Down-regualation
P-cadherin	Up-regulation		Up-regulation
HER2	controversial	Overexpression/ fattore prognostico	Overexpression/ fattore prognostico
mTOR e p-mTOR	n.d.	Espressione nel fenotipo triplo negativo	Espressione nel fenotipo triplo negativo
stk-RON	n.d.	Overespressione	Overespressione

Tab. 2.

molecolari relativi a fattori di crescita angiogenetica che sostengono la crescita tumorale; tra questi annoveriamo il fattore VEGFA che è overespresso a livello neoplastico e a livello stromale nel 90% dei casi analizzati.

Le COX-2 (ciclossigenasi) enzimi coivolti nel processo infiammatorio ma recentemente anche mediatori della crescita tumorale, sono state invece identificate e sequenziate nella specie felina e risultano overespresse nell'87% dei casi, suggerendo il loro coinvolgimento nella progressione del tumore mammario felino e rappresentando un eventuale target terapeutico con inibitori specifici contro le COX-2.

Tutti questi dati sono sovrapponibili a quelli ottenuti in campo umano, e dimostrano la significativa omologia di questo tumore con il breast cancer umano. Come accennato precedentemente anche il tumore mammario canino (CMC) nella sua forma semplice rappresenta un buon modello per il tumore mammario della donna. A livello molecolare questo tumore è stato maggiormente studiato rispetto al FMC e le informazioni che possediamo sono relativamente maggiori.

Studi genomici eseguiti in paragone al tumore mammario umano hanno evidenziato che in entrambi i tumori vengono regolati in maniera anomala i pathways molecolari che includono

PI3K/AKT, KRAS, PTEN, WNT-beta catenina e MAPK, suggerendo una chiara e vicina somiglianza interspecie di questi network nella regolazione di questo tumore (Uva *et al*., 2009).

Tra i geni studiati in paragone al tumore mammario umano, ricordiamo la famiglia dei geni che codificano per i tumor suppressor BRCA1 e 2 che sono rispettivamente down regolati e up-regolati nel CMC; questi dati dimostrerebbero, come nella donna, la predisposizione genetica di alcuni soggetti di sviluppare questo tumore (Rivera *et al*., 2009).

Sempre riguardo a molecole ad attività tumour suppressor, TP53 risulta mutato e overespresso nel tessuto maligno rispetto alla ghiandola mammaria normale, e rappresenta un fattore prognostico negativo nel tumore mammario canino e umano.

Ulteriori studi molecolari eseguiti sul CMC riguardano molecole coinvolte nell' adesione cellulare quali E-cadherin, P-cadherin e Sialyl Lewis X, che risultano rispettivamente downregolate e up-regolate in entrambe le specie.

Infine articoli appena pubblicati mediante studi "genome wide" hanno dimostrato come nelle razze English Springer Spaniel a livello del cromosoma 11 il locus genico *CDK5RAP2* svolge un ruolo importante nella predisposizione del tumore mammario (Melin *et al*., 2016).

I dati molecolari appena descritti sono riassunti nella Tab. 2.

Bibliografia

- Ariazi E.A., J.L. Ariazi, F., Cordera, V.C. Jordan. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. Current Topics in Medicinal Chemistry 2006, 6: 181–202.
- Burrai GP, Mohammed SI, Miller MA, Marras V, Pirino S, Addis MF, Uzzau S, Antuofermo E.
- Calieri D, Zappulli V, Rasotto R, Cardazzo B, Frassinetti F, Goldschmidt M H, Castagnaro M. Triple-negative vimentin-positive heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential comparative model for breast cancer. BMC Veterinary Research 2014, 10: 185.
- Chang CC, Tsai MH, Liao JW, et al. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. Journal of American Veterinary Medical Association 2009;235:391–396.
- De campos C B, Damasceno K A, Gamba C O, Ribeiro A M, Machado C J, Lavalle G E, Cassali G D. Evaluation of ptognostic factors and survival rates in malignat feline mammary gland neoplasms. Jornal of Feline Medicine and Surgery 2015; Oct 12 Epub ahead of print.
- Donnay, I., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G., Verstegen, J. P., 1996. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal and neoplastic canine mammary tissues. Research in Veterinary Science 60, 251-254.
- Geraldes, M., Gärtner, F., Schmitt, F., 2000. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. The Veterinary Record 46, 403-406.
- Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. Vet Pathol. 2011 Jan;48(1):117-31.
- Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline at Universita di Pisa/SBA on February 10, 2014vet.sagepub.comDownloaded from recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Oncol Pract. 2010;6:195–197.
- Hayden D. W., Barnes, D. M., Johnson, K. H., 1989. Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats : a retrospective study. Veterinary Pathology 26, 104-113.
- Hughes K, Dobson JM Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. Vet J. 2012 Oct;194(1):19-26
- Illera JC, Perez-Alenza MD, Nieto A, et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. Steroids. 2006;71:541–548.
- Kapil U, Bhadoria AS, Sareen N, Singh P, Dwivedi SN. Reproductive factors and risk of breast cancer: A Review. Indian J Cancer. 2014 Oct-Dec;51(4):571-6. doi: 10.4103/0019-509X.175345. PubMed PMID: 26842199.
- Klopfleisch R, Schutze M, Gruber AD. Downregulation of transforming growth factor beta (TGF beta) and latent TGF beta binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. Vet J. 2010;186:379–384.
- Kristiansen V M, Peña L, Diez Córdova L, Illera J C, Skjerve E, Breen A M, Cofone M A, Langeland M, Teige J, Goldschmidt M, Sørenmo K U. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. Journal of Veterinary Internal Medicine 2016; 30: 230-241.
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 4. Edited by Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO/IARC pubblications. 2012.
- Martin de las Mulas J, Millan Y, Dios R. A prospective analysis of immunohistochemi-

cally determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. Vet Pathol. 2005;42:200–212.
- Martin de las Mulas S J, van Niel M, Millan Y, Ordas J, Blankenstein M A, van Mil F, Misdorp W. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. Research in Veterinary Science 2002; 72: 153-161.
- Martin de las Mulas S J., van Niel M., Millan Y., Blankestein M A., van Mil F, Misdorp W. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesion: comparison with biochemical assay. Domestic Animal Endocrinology 2000; 18: 111-125.
- Melin M, Rivera P, Arendt M, Elvers I, Murén E, Gustafson U, Starkey M, Borge KS, Lingaas F, Häggström J, Saellström S, Rönnberg H, Lindblad-Toh K. Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumours. PLoS Genet. 2016 May 9;12(5)
- Millanta F, Calandrella M, Bari G, et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. Research in Veterinary Sciences. 2005;79:225–232.
- Millanta F., Calandrella M., Vannozzi I, Poli A. Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. Veterinary Record 2006 158: 821-824.
- Mills SW, Musil KM, Davies JL, Hendrick S, Duncan C, Jackson ML, Kidney B, Philibert H, Wobeser BK, Simko E. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. Vet Pathol. 2015 Mar;52(2):238-49.
- Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP: Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd ser., vol. 7. Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization, Washington, DC, 1999.
- Moe, L. (2001) Population based incidence of mammary tumours in some dogs breeds. J Reprod Fertil Suppl 57:439–443.
- Morris JS, Nixon C, King OJ, Morgan IM, Philbey AW. Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER alpha and p53. Veterinary journal 2009;179:422–429.
- Nieto A, Peña L, Perez-Alenza MD, et al. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. Vet Pathol. 2000;37:239–247.
- Pang LY, Argyle DJ (2009) Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. Biochimica et Biophysica Acta, 1792, 380e391.
- Peña L, De Andrés PJ, Clemente M, Cuesta P, Pérez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. Vet Pathol. 2013 Jan;50(1):94-105.
- Peña L., Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gärtner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, de las Mulas JM. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. Veterinary Pathology 2014 51: 127-141.
- Pinho S. S., Carvalho S., Cabral J., Reis C. A., Gärtner F. canine tumours: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. Translational Research 2012, 159: 165-172.
- Port Louis L R, Varshney K C, Nair M G. Am immunohistochemical study on the xpres-

sion of sex steroid receptors in canine mammary tumors. ISRN veterinary science 2012 Feb 15; 2012:378607.
- Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. In Vivo. 2011 May-Jun;25(3):455-65. PubMed PMID: 21576423.
- Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, von Euler H. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2 Cancer Res. 2009 Nov 15;69(22)
- Sinn HP e Kreipe H: Breast Care 2013;8:149–154Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. BMC Cancer. 2010 22; 10:156.
- Tan PH, e Ellis IO: J Clin Pathol 2013;66:465–470. doi:10.1136/jclinpath-2012-201078
- Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, La Monica N, de Rinaldis E Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors BMC Genomics. 2009 Mar 27;10:135. doi: 10.1186/1471-2164-10-135.
- Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., et al. (2009) Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. BMC Vet Res 5:39.
- Vinothini G, Balachandran C, Nagini S. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: correlation with histological grading. Oncol Res 2009; 18: 193-201.
- Wehrend A, Hospes E,e Gruber AD. Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with a progesterone-antagonist. The Veterinary Record 2001; 148, 346-347.
- Yang WY, Liu CH, Chang CJ, et al. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. J Comp Pathol. 2006;134:70–79.Beauvais W, Cardwell JM, Brodbelt DC. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs--a systematic review. J Small Anim Pract. 2012 Jun;53(6):314-22. doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01220.x. Review. PubMed PMID: 22647210.
- Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M. Feline mammary tumours in comparative oncology. J Dairy Res. 2005;72 Spec No:98-106. Review. PubMed PMID: 16180727.

IL MELANOMA MALIGNO CANINO IN ONCOLOGIA COMPARATA

CHIARA BRACHELENTE[1], MONICA SFORNA[1], ILARIA PORCELLATO[1],
LAURA BONGIOVANNI[2], RAFFAELLA DE MARIA[3], LUCA MECHELLI[1]

[1] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Perugia; [2] Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo; [3] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Introduzione

Il melanoma è il tumore cutaneo a più alta mortalità nella specie umana e, nonostante gli sforzi profusi nella ricerca in campo biomedico, continua a rappresentare un'importante problematica inerente alla salute pubblica. Basti pensare che tra il 1975 e il 2010, mentre l'incidenza della maggior parte dei tumori solidi è andata stabilizzandosi o riducendosi, quella del melanoma ha evidenziato un incremento pari al 3% annuo (9).

L'insorgenza di tumori melanocitari è stata osservata anche in molti mammiferi domestici: nel cavallo (in cui mostrano frequente progressione neoplastica), nella capra, nel gatto e nel suino (in cui sono state osservate forme congenite e guarigioni spontanee). Nel cane, in particolare, questi tumori rappresentano una forma neoplastica di frequente riscontro, costituendo circa il 3% sul totale delle neoplasie e fino al 7% dei tumori maligni.

In quest'ultima specie, le neoplasie melanocitarie rappresentano un gruppo di tumori estremamente eterogeneo per sede, morfologia e comportamento biologico.

La sede più frequentemente interessata è la cavità orale (56%), contrariamente all'uomo in cui l'insorgenza a livello orale è rara e prevale la localizzazione cutanea. Frequente nel cane è anche la localizzazione labiale, definita spesso "giunzionale" (23%), seguita da quella cutanea (11%) e digitale (8%) (figg. 1 e 2). Altre sedi, compreso l'occhio, rappresentano circa il 2% (3).

Sulla base delle caratteristiche istopatologiche i tumori melanocitari sono stati distinti in melanomi maligni e, nella loro controparte benigna, in melanocitomi. Sono stati inoltre identificati i melanoacantomi, tumori con caratteristiche intermedie tra melanocitomi compositi e tumori epiteliali benigni; forme simil-tumorali (lentigo simplex); e lesioni melanocitarie iperplastiche (8). La variabilità citologica e istologica di questi tumori, e in particolare del melanoma, risulta estrema: possono essere costituiti da cellule a citotipo fusato, rotondo, poligonale, epitelioide, dendritico o chiaro, spesso molteplice all'interno di uno stesso tumore (figg. 3 e 4) (11). Il contenuto di melanina varia da tumori in cui non si osserva la presenza di pigmento melanico e per questo definiti melanotici (fig. 5), tendenzialmente anaplastici, a tumori costituiti da cellule fortemente pigmentate, in cui i caratteri citomorfologici risultano oscurati (10). Anche i pattern di accrescimento sono tra i più diversi (fasci, pacchetti, foglietti, ecc.) con presenza o meno di attività giunzionale (proliferazione di cluster di melanociti lungo la giunzione dermo-epidermica) (fig. 6) e crescita pagetoide (proliferazione di cluster di melanociti nello spessore dell'epitelio). Tale variabilità sembra riflettere il comportamento biologico dei tumori melanocitari.

A oggi, non esistono metodi diagnostici in grado di differenziare con certezza i melanomi dagli altri tumori melanocitari quando la morfologia esprime caratteri intermedi. Ne consegue una difficile classificazione e definizione della prognosi, sebbene dimensioni del tumore, indice mitotico e atipia nucleare siano stati indicati come importanti elementi differenziali (6-11). Anche la sede del tumore esprime un importante valore ai fini prognostici: i melano-

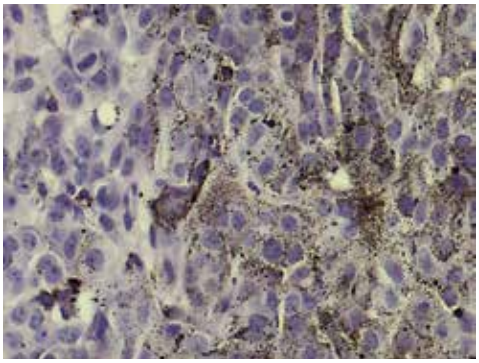


Fig. 1. Cane. Melanoma orale (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 40x)

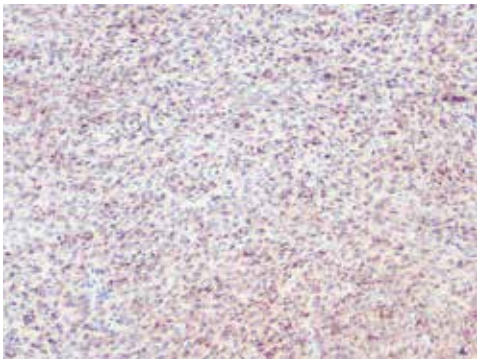


Fig. 2. Cane. Melanoma cutaneo. Immunoistochimica per Melan-A, con positività granulare citoplasmatica diffusa (AEC/Ematossilina di Carazzi; ingr. 10x)

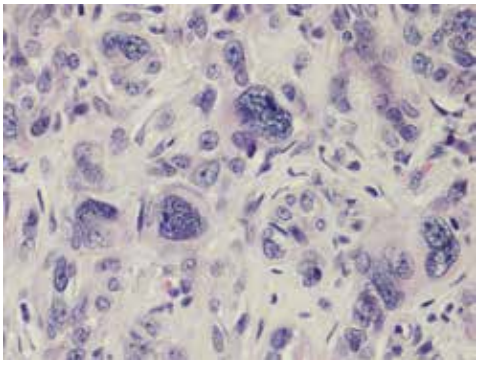


Fig. 3. Cane. Melanoma orale. Marcata atipia cellulare con spiccate anisocitosi e anisocariosi (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 40x)

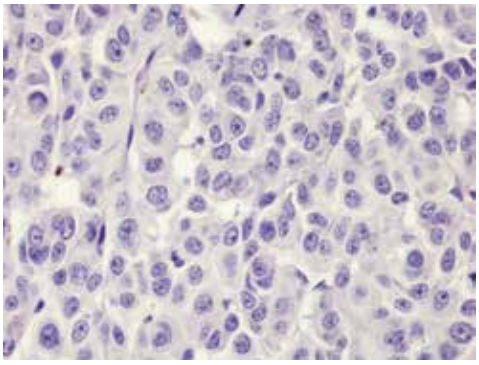


Fig. 4. Cane. Melanoma orale. Morfotipo a cellule epitelioidi, scarsamente pigmentato (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 40x)

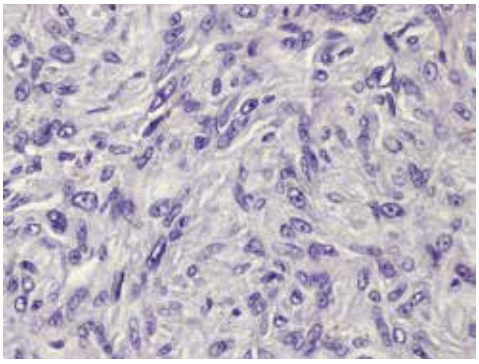


Fig. 5. Cane. Melanoma orale. Morfotipo a cellule fusate, amelanotico (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 40x)

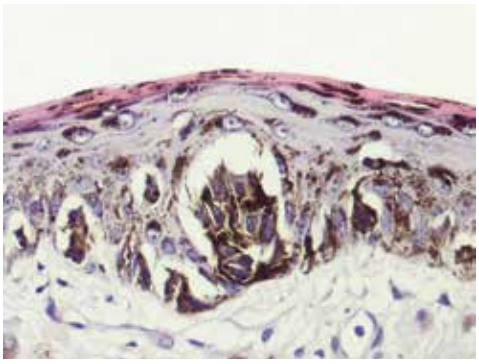


Fig. 6. Cane. Melanoma cutaneo. Attività giunzionale nel melanoma: cluster di cellule melanocitarie intraepiteliali, fortemente pigmentate (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 40x)

Caratteristiche	*MM canino*	*MM umano*
Sede più comune	Cavità orale	Testa/collo (59-80% cavità nasale; 16-41% cavità orale)
Range di morfologia cellulare	V	V
Crescita intraepiteliale e coinvolgimento mucosale	V	V
Estensione nella lamina propria e sottomucosa	V	V
Necrosi e ulcerazione	V	V
Anaplasia, figure mitotiche bizzarre, nucleoli prominenti	V	V
Metastasi linfonodali al momento della diagnosi	V (25%)	V (21-61%, in funzione della sede del tumore primitivo)
Forme amelanotiche più frequenti (che nel MC)	V	V (40%)
Espressione di markers di differenziazione melanocitaria	V	V
Schema classificativo (grading, staging) non universalmente riconosciuto	V	V
Prognosi infausta	V	V (25% di sopravvivenza a 5 anni)
% di tutti i tumori melanocitari	62	2
Mutazioni KIT	-	V (15-39%)
Mutazioni NRAS	V (11%)	V (15%)
Mutazioni PTEN (loss)	V (7,4%)	V
Mutazioni CDK4 (gain)	-	V
Mutazioni BRAF	-	-
Mutazioni GNAQ	-	-
Riferimenti bibliografici	Simpson *et al*., 2014; Gillard *et al*., 2014	Mihajlovic *et al*., 2012; Ballester Sanchez *et al*., 2015;

Tab. 1. Caratteristiche del Melanoma Mucosale (MM) canino e umano a confronto.
V: presenza; -: assenza delle caratteristiche elencate

mi orali del cane mostrano un comportamento biologico tendenzialmente più aggressivo rispetto alla controparte cutanea e buona parte di essi ha già prodotto metastasi linfonodali al momento della prima diagnosi (10).

Nell'uomo, i fattori di rischio per il melanoma includono la predisposizione familiare (mutazione del gene CDKN2A), le caratteristiche di pigmentazione di cute e mucose, l'esposizione alle radiazioni attiniche (soprattutto UV-B), oltre alle reazioni irritative cutanee a seguito dell'esposizione al sole. Nel cane, diversamente, non c'è ancora consenso per quanto

riguarda fattori eziologici specifici coinvolti nella patogenesi delle neoplasie melanocitarie. La radiazione ultravioletta non sembra essere tra i principali fattori eziopatogenetici in questi tumori, mentre le ipotesi più accreditate includono la familiarità, gli eventi traumatici, l'esposizione a sostanze chimiche, alcune sollecitazioni ormonali e la predisposizione genetica (2).

A oggi, il melanoma del cane è considerato il miglior modello animale per lo studio comparato con le forme neoplastiche dell'uomo, in particolare per quanto riguarda i melanomi orali. Infatti, oltre a essere un animale sinantropo, costituendo quindi una possibile sentinella ambientale, il genoma e le sequenze proteiche di questa specie sono più simili a quelle umane di quanto lo siano quelle murine (2).

Morfologia, istologia e fattori prognostici dei melanomi cutanei

I tumori melanocitari cutanei nel cane comprendono forme benigne (melanocitoma, melanoacantoma) e forme maligne (melanoma). In questa specie, l'apparato tegumentario rappresenta la terza sede di insorgenza dei tumori melanocitari, dopo la cavità orale e le labbra (Gross *et al*., 2005). I melanomi condividono con i melanocitomi alcuni aspetti epidemiologici relativi all'assenza di una predisposizione di sesso, all'età media d'insorgenza (9 anni) e alle razze più frequentemente colpite. Tra queste vi sono quelle a intensa pigmentazione quali Scottish terrier, Airedale, Boston terrier, Schanuzer (nano e standard), Dobermann, Viszla, Golden retrive, Chesapeake Bay retriever, Setter irlandese, Chow chow, Boxer, Cocker e Springer spaniel. La maggior parte dei tumori cutanei melanocitari del cane ha un comportamento biologico benigno, sebbene alcune localizzazioni siano associate a una prognosi peggiore, in particolare le giunzioni mucocutanee (labbra) e le estremità distali degli arti. In quest'ultima sede, il coinvolgimento del letto ungueale è di solito associato a un comportamento localmente invasivo ma con bassa tendenza alla metastatizzazione (Gross *et al*., 2005). Le metastasi, laddove presenti, sono prevalenti a livello linfonodale, mentre il polmone risulta coinvolto in misura minore (Smith *et al*., 2002). I melanocitomi sono comuni nei cani (3-4% dei tumori cutanei) e si presentano generalmente come noduli solitari, circoscritti, di colore più o meno scuro (a seconda della profondità), alopecici, con diametro spesso inferiore al centimetro. I melanomi cutanei (MC) hanno aspetto molto variabile e tendono a mostrare una crescita asimmetrica. Le dimensioni variano da alcuni millimetri fino a 10 centimetri di diametro, sebbene il diametro non rappresenti un indicatore affidabile di malignità. Il colore è variabile, dal grigio o marrone al nero, bluastro o rosso. Le lesioni possono presentarsi come lesioni cupoliformi con superficie liscia, noduli sessili o polipoidi, lesioni a placca o masse multilobulate. I tumori di dimensioni maggiori sono spesso ulcerati. Le cellule neoplastiche possono invadere profondamente il tessuto sottocutaneo e i piani fasciali.

Gli aspetti istopatologici e i modelli di crescita dei tumori melanocitari sono molteplici e sono rappresentati da cellule fusate, cellule rotonde o poligonali, cellule epitelioidi, cellule dendritiche o cellule chiare che possono organizzarsi in foglietti, pacchetti o cordoni. Il contenuto di melanina nelle singole cellule tumorali può variare: i morfotipi fusati, rotondi, poligonali e a cellule chiare hanno spesso una pigmentazione melanocitaria scarsamente rappresentata e irregolarmente distribuita, mentre le cellule tumorali di aspetto epitelioide e le cellule di aspetto dendritico tendono a essere marcatamente pigmentate. Tuttavia, diversi studi retrospettivi indicano che il morfotipo delle cellule neoplastiche non ha valore prognostico. I melanocitomi hanno generalmente una componente mista fusata e/o epitelioide, con una crescita giunzionale (presenza di cluster o di nidi di melanociti neoplastici intraepidermici), composta (crescita intraepidermica e dermica contemporaneamente) o esclusivamente dermica. Raramente è possibile osservare una proliferazione melanocitaria esclusivamente nella porzione periannessiale follicolare (melanocitoma neurocristico pilare). I MC sono neoplasie relativa-

mente ben circoscritte, non capsulate che coinvolgono l'epidermide e il derma o solo quest'ultima sede; le masse di dimensioni più grandi possono estendersi al sottocute. L'epidermide sovrastante può essere iperpigmentata indipendentemente o meno dalla presenza o dall'assenza di "attività giunzionale". L'ulcerazione e la necrosi sono aspetti di frequente riscontro nelle masse di dimensioni maggiori. L'incontinenza del pigmento è un evento frequente, cui consegue la presenza di numerosi melanofagi dispersi tra le cellule neoplastiche. Il collagene stromale è generalmente scarso e può occasionalmente mostrare foci di metaplasia condroide e/o ossea. Perifericamente può essere presente una popolazione reattiva di linfociti e plasmacellule. Nei tumori scarsamente pigmentati la colorazione Masson-Fontana (impregnazione argentica) può confermare la presenza di melanina citoplasmatica anche in quantità ridotte. In alcuni tumori melanociti, tuttavia, le lesioni possono essere così intensamente pigmentate da oscurare gli aspetti nucleari. In questi casi, per una adeguata valutazione degli elementi morfologici di riferimento si rende necessaria una decolorazione (melanin bleach) che si avvale dell'impiego di una soluzione di permanganato di potassio e di acido ossalico. Per la diagnosi di MC, a integrare le indagini istopatologiche, vengono utilizzate tecniche immunoistochimiche nei confronti di antigeni espressi dalle cellule melanocitarie (Melan-A/MART-1, S-100, vimentina ed "enolasi neurono specifica" – NSE) o tecniche di microscopia elettronica per l'evidenziazione dei melanosomi nelle cellule neoplastiche. La prima indagine per la ricerca di possibili criteri prognostici istologici effettuata da Bostock, nel 1979, aveva individuato, come elemento discriminante, il numero di figure mitotiche nella popolazione di cellule neoplastiche. Tuttavia, la gran parte degli studi effettuati da allora su questo argomento hanno concluso che ''non esiste una sola tecnica diagnostica in grado di differenziare le neoplasie melanocitarie benigne da quelle maligne o in grado di predire con affidabilità il tempo di sopravvivenza (Smith *et al*., 2002). Due recenti lavori (Spangler e Kass, 2006; Smedley *et al*., 2011) hanno determinato, per i tumori melanocitari cutanei e digitali, i seguenti criteri prognostici negativi: indice mitotico superiore a 3 mitosi per 10 campi a elevato ingrandimento scelti in maniera casuale; presenza di atipie nucleari superiori al 20% delle cellule neoplastiche; indice Ki67 superiore al 15%; presenza di ulcerazione; invasione linfatica e invasione del tessuto sottocutaneo da parte delle cellule neoplastiche.

In aggiunta ai criteri morfologici, alcuni autori hanno tentato di individuare ulteriori marcatori immunoistochimici quali fattori prognostici. Quelli che, secondo alcuni studi, hanno dimostrato risultati più incoraggianti sono: l'indice di proliferazione nucleare (Ki-67 antigene) (Laprie *et al*., 2001); la glicoproteina di superficie cellulare implicata nell'adesione intercellulare CD44 (Lacroux *et al*., 2012); la beta catenina e la survivina (Bongiovanni *et al*., 2015). Al contrario, altri fattori che vengono utilizzati in medicina umana, come ad esempio la perdita dell'espressione del KIT, non sembrano avere un analogo rilievo in medicina veterinaria (Gomes *et al*., 2012).

Morfologia, istologia e fattori prognostici dei melanomi mucosali del cane

Il melanoma rappresenta la neoplasia orale maligna più frequentemente riscontrata nel cane, con una prevalenza stimata di 12,7 per 10.000 casi di tumore o del 6% di tutti i tumori del cane (Newman, 2012).

Il melanoma orale (MO) del cane è una neoplasia con un comportamento biologico aggressivo, caratterizzata da rapida crescita, con attività infiltrante locale, coinvolgimento locale del tessuto osseo (57% delle lesioni) e frequente metastatizzazione ai linfonodi regionali (dal 30,3% al 74%) (Iussich, 2016; Nishiya, 2016). Molto elevata è la percentuale di metastatizzazione per via linfatica ed ematica, anche in sedi lontane, quali il polmone (Jubb e Kennedy, 2016). Nella cavità orale, il melanoma prende origine dai melanociti mucosali o dello stroma

superficiale, localizzandosi prevalentemente a livello della mucosa gengivale e della mucosa labiale, con un coinvolgimento meno frequente per palato, lingua e faringe (Spangler, 2006). I melanomi orali sono maggiormente rappresentati in cani di piccola taglia e con mucosa orale pigmentata, con particolare predisposizione da parte di cocker Spaniel, barboncini, pechinesi, bassotti, Golden Retrievers e Gordon Setter (Nishiya, 2016). Sebbene la lingua sia raramente sede primaria di neoplasie, il melanoma rappresenta comunque la forma più frequente, con predisposizione particolare per le razze di taglia grande, in particolare Chow Chow e Shar Pei. L'età d'insorgenza varia da 10,5 a 12 anni, ma può essere osservata anche in animali più giovani (Bergman, 2007; Nishiya, 2016). Sebbene in passato sia stata riportata un'insorgenza prevalente nei cani maschi, recenti lavori smentirebbero una predisposizione di sesso nel melanoma orale (Nishiya, 2016).

L'aspetto istologico del MO varia notevolmente, da neoplasie relativamente ben differenziate, fortemente pigmentate a melanomi amelanotici anaplastici (Jubb e Kennedy, 2016); sulla base della morfologia delle cellule neoplastiche vengono indicati tre modelli di crescita principali: 1) epitelioide, 2) a cellule fusate, 3) di tipo misto. La diagnosi di melanoma orale amelanotico risulta spesso molto complessa. Un aspetto istologico importante nel supportare la diagnosi è l'evidenziazione di un'attività giunzionale da parte delle cellule neoplastiche nei confronti della porzione dermo-epidermica. Tuttavia l'impiego di metodiche immunoistochimiche con l'utilizzo di anticorpi monoclonali nei confronti di Melan-A, PNL2, TERP-1, TRP-2, garantisce un'elevata sensibilità e una adeguata specificità per la definizione della neoplasia (Smedley, 2011).

Il melanoma è uno dei rari tumori degli animali per in cui la sede d'insorgenza rappresenta un indicatore prognostico importante. Infatti, l'affermazione che tutti i tumori melanocitari orali del cane sono maligni è comunemente riportata nella letteratura scientifica, fino a rappresentare oramai un dogma in oncologia veterinaria. Tuttavia, un numero sempre maggiore di lavori recenti sembra identificare alcuni sottogruppi di tumori melanocitari, orali e labiali (mucosali), con una prognosi più favorevole (Spangler, 2006; Smedley, 2011). In relazione alla distribuzione nella cavità orale e al tasso di mortalità Spangler e Kass (2006) considerano la gengiva, la lingua, il palato e la faringe come sedi più frequentemente associate a una prognosi sfavorevole (elevato tasso di mortalità), mentre i tumori che insorgono a carico della mucosa labiale sembrano avere un comportamento biologico meno aggressivo e, di conseguenza, una prognosi migliore. Inoltre, per la sede orale e labiale, alcuni lavori indicano un maggior tempo di sopravvivenza per quelle neoplasie fortemente pigmentate rispetto a quelle amelanotiche o con una pigmentazione bassa o moderata; tuttavia, assenza o scarsità di pigmento melanico non sono considerati parametri affidabili nel predire una prognosi sfavorevole (Bergin, 2011). Studi recenti hanno definito alcuni parametri morfologici in grado di esprimere un valore prognostico particolarmente affidabile per il MO del cane, quali l'atipia nucleare e l'indice mitotico. Il primo dei due parametri, infatti, quando definito con criteri rigorosi, rappresenta uno dei fattori istologici più importanti nel delineare un valore prognostico (Bergin, 2011). In numerosi studi l'indice mitotico è valutato contando il numero di mitosi in 10 campi a elevato ingrandimento consecutivi e non sovrapposti iniziando dai campi con maggiore attività mitotica. In base a questo criterio, per i tumori della cavità orale e labiali un indice mitotico ≥4 per 10 hpf è stato associato con un aumento del rischio di morte a un anno dalla diagnosi (Smedley, 2011). Altri aspetti delle neoplasie melanocitarie orali, quali la presenza di infiammazione, la necrosi, il grado di pigmentazione e l'ulcerazione, possono essere associati con la prognosi, ma non esistono evidenze oggettive e valori soglia di riferimento che ne rendano valido l'utilizzo in oncologia veterinaria. Dal punto di vista immunoistochimico, la valutazione dell'espressione di Ki67 nei MO del cane rappresenta un importante parametro con cui può essere correlata una prognosi sfavorevole nei tumori che esprimono un valore soglia del ki67 ≥19,5 (Bergin, 2011), così come la valutazio-

ne dell'espressione del c-kit si correla con la sopravvivenza di cani con melanomi mucosali (Newmann, 2012). Lavori recenti dimostrerebbero un ruolo di PDGFRs-α e PDGFRs-β nella patogenesi dei CMM; la loro coespressione da parte dei melanociti neoplastici dovrebbe essere presa in considerazione come marker prognostico negativo (Iussich, 2016). Alla luce di quanto fin qui riportato e in accordo con numerosi Autori, nella valutazione diagnostica e prognostica del MO del cane risulta necessario l'uso di un panel oncologico che prenda in considerazioni il numero maggiore di parametri prognostici, morfologici e immunoistochimici, per definirne in maniera accurata il comportamento biologico.

Caratteristiche molecolari del melanoma canino

Per quanto riguarda le caratteristiche molecolari del melanoma canino sia cutaneo sia mucosale, il lavoro più completo a riguardo è stato eseguito da Gillard *et al*. (2014). In questo lavoro gli autori hanno ottenuto cDNA da 35 casi di melanomi (27 orali e 8 cutanei) e 28 casi di tessuto sano dello stesso soggetto affetto da melanoma. Su tutti i casi è stata eseguita l'analisi di mutazione per i geni codificanti per PTEN, TP53, KRAS, BRAF, c-kit e CDK4. I risultati ottenuti hanno evidenziato che nessun melanoma cutaneo presentava mutazioni a carico di questi geni, mentre nella forma mucosale sono state riscontrate mutazioni a carico dei geni KRAS e PTEN ma a una frequenza più bassa rispetto al melanoma umano (tab. 1); risultano invece assenti mutazioni a carico dei geni c-kit, TP53 e BRAF, confermando dati già presenti in letteratura (Murakami *et al*., 2011). La ridotta presenza di mutazioni geniche suggerisce che nel cane il melanoma sia cutaneo sia mucosale non abbia una eziologia UV-dipendente. Per quanto riguarda invece studi molecolari finalizzati a valutare l'espressione genica di trascritti genici specifici, ricordiamo la valutazione del trascritto della beta catenina, che risulta maggiormente espressa nelle forme maligne rispetto a quelle benigne, e la sua localizzazione immunoistochimica principalmente a livello nucleare, suggerisce il suo ruolo di fattore trascrizionale nucleare (Han *et al*., 2010). Recentemente infine alcuni autori hanno dimostrato come la via di trasduzione PI3K/mTOR sia attivata nel melanoma mucosale canino, confermando ulteriormente il modello mucosale canino per la controparte umana (Wei *et al*., 2016).

Aspetti comparativi dei tumori melanocitari dell'uomo e del cane

La maggiore incidenza di forme maligne e più aggressive tra i melanomi mucosali rispetto a quelli cutanei, l'elevata incidenza in razze a intensa pigmentazione, la scarsa rilevanza del ruolo eziopatogenetico dei raggi ultravioletti (UV) nell'insorgenza e nella progressione di tali forme neoplastiche, rappresentano le principali differenze tra il melanoma del cane e il corrispettivo tumore dell'uomo.

Ciò premesso e alla luce dei dati presenti in letteratura, è possibile osservare come il melanoma mostri numerosi aspetti comuni tra uomo e cane, tanto da attrarre l'attenzione di molti gruppi che operano nell'ambito dell'oncologia comparata, divenendo oggetto di numerose indagini volte all'individuazione di marker prognostici e target terapeutici. In particolare, il melanoma maligno orale del cane viene considerato un ottimo modello per lo studio del melanoma mucosale dell'uomo, che rappresenta una patologia neoplastica rara e un'entità biologicamente distinta dal melanoma cutaneo, poco studiata e altamente aggressiva.

Melanoma cutaneo (MC) canino e umano a confronto

Le maggiori differenze tra le due specie si osservano per quanto riguarda il melanoma cuta-

neo. Questo perché tali forme nell'uomo sono strettamente legate a una prolungata, intensa o intermittente esposizione ai raggi UV; si verificano maggiormente in soggetti con pelle chiara, poco pigmentata, rappresentando le forme maggiormente maligne e aggressive, correlate a elevati tassi di metastatizzazione e mortalità (Bastian, 2014). Anche dal punto di vista della classificazione istopatologica si osservano delle differenze, in quanto le forme maggiormente descritte nell'uomo sono il SSM (*superficial spreading melanoma*), il LMM (*lentigo maligna melanoma*), il melanoma nodulare (NM, *nodular melanoma*) e l'ALM (*acral lentiginous melanoma*). In particolare, le prime due forme vengono associate a un'esposizione a UV rispettivamente intermittente e intensa (Bastian *et al*., 2014), ma solo raramente sono osservate nel cane (Gillard *et al*., 2014). La forma più frequentemente descritta nel cane, caratterizzata da un prevalente coinvolgimento del derma, corrisponderebbe al melanoma nodulare dell'uomo, che non sembra essere direttamente correlato all'azione di queste radiazioni (Bastian *et al*., 2014). Sebbene sia riconosciuta una classificazione delle lesioni melanocitarie dell'uomo in base alla fase e tipo di crescita, radiale o verticale, oggi si ritiene che il melanoma nodulare e il SSM siano due entità distinte, con caratteri molecolari e genetici differenti, che riconoscono una diversa eziopatogenesi (Greenwald *et al*., 2012). Molte delle caratteristiche istopatologiche osservate nel melanoma umano sono state associate alla presenza di specifiche mutazioni (Scolyer *et al*., 2011). Per esempio, melanomi con mutazioni di BRAF sono istologicamente classificati come SSM ed eziologicamente associati con un'esposizione intermittente ai raggi UV (Broekeart *et al*., 2010). Nessuna correlazione simile è stata fino a ora descritta nella specie canina. Esistono diversi studi che hanno messo in evidenza mutazioni di geni specifici anche nel cane (Simpson *et al*., 2014), tuttavia, tali studi si riferiscono principalmente al melanoma maligno orale, mentre non sono state ancora del tutto identificate alterazioni genetiche caratteristiche del melanoma maligno cutaneo o acrale (Gillard *et a*l., 2014). Un'altra importante differenza tra il MC dell'uomo e del cane si riscontra quando si paragonano i fattori prognostici: lo spessore tumorale (*Breslow infiltration depth*) rappresenta il più importante elemento prognostico nel MC dell'uomo, mentre non sembra essere rilevante nel cane, dove la dimensione della massa neoplastica non sembra rappresentare un indicatore affidabile di malignità (Smedley *et al*., 2011).

Considerando il MC, le forme che originano in regioni anatomiche non particolarmente esposte ai raggi UV, come le giunzioni muco-cutanee o le estremità distali degli arti, caratterizzate nel cane da una prognosi peggiore, potrebbero mostrare maggiori analogie nel loro assetto molecolare e genetico, quindi essere oggetto di approfondimenti di ricerca e rappresentare dei modelli validi per lo studio delle corrispettive forme dell'uomo.

Melanoma mucosale (MM) canino e umano a confronto

Diversamente dal cane, il MM rappresenta nell'uomo una forma molto rara, con un'incidenza pari all'1% circa di tutti i casi di melanoma diagnosticati (Ballester Sanchez *et al*., 2015) con maggiore incidenza in soggetti neri, asiatici e ispanici. Inoltre per questa forma i fattori di rischio restano sconosciuti, l'età di insorgenza appare più tardiva e la prognosi più infausta, con una sopravvivenza pari a 5 anni nel 25% circa dei casi, contro l'85% osservata nei MC. Il MM rappresenta nell'uomo un'entità distinta dal MC, come dimostrato anche dal diverso assetto molecolare e genetico, dove si evidenziano rare mutazioni di BRAF e più frequenti mutazioni a carico di KIT (Mihajlovic *et al*., 2012). Come si evince dai dati riportati in tab. 1, le numerose analogie osservate indicano il MM del cane come un potenziale modello per lo studio del MM dell'uomo, incoraggiando studi che possano meglio caratterizzare tali forme neoplastiche anche attraverso l'utilizzo di trials clinici effettuati su pazienti canini. In particolare, sono stati recentemente condotti numerosi studi nel cane, così come nell'uo-

mo, per individuare e sottoporre a test differenti strategie immunoterapeutiche volte a provocare una risposta immunitaria anti-tumorale sia innata sia adattiva nei confronti di diversi markers. Recentemente è stato autorizzato per il trattamento del MM del cane un vaccino a DNA plasmidico che esprime la tirosina umana (Atherton *et al*., 2016) e la proteina CSPG4 (Riccardo et al 2014).

I risultati fino a ora ottenuti in medicina veterinaria appaiono di enorme importanza alla luce della mancanza di una terapia efficace di questa rara forma neoplastica dell'uomo, e aprono la strada a future collaborazioni tra oncologi e ricercatori che porteranno a reciproci contributi nella ricerca di un trattamento efficace per questa malattia così aggressiva in entrambe le specie.

Bibliografia

- Adriana Tomoko Nishiya, Cristina Oliveira Massoco, Claudia Ronca Felizzola, Eduardo Perlmann, Karen Batschinski, Marcello Vannucci Tedardi, Jéssica Soares Garcia, Priscila Pedra Mendonça, Tarso Felipe Teixeira and Maria Lucia Zaidan Dagli, Comparative Aspects of Canine Melanoma, Vet. Sci. 2016, 3(1), 7
- Atherton MJ, Morris JS, McDermott MR, Lichty BD. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. Vet Immunol Immunopathol. 2016;169:15-26.
- Ballester Sánchez R, de Unamuno Bustos B, Navarro Mira M, Botella Estrada R. Mucosal melanoma: an update. Actas Dermosifiliogr. 2015;106(2):96-103.
- Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. Annu Rev Pathol. 2014;9:239-71.
- Bergin IL1, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M., Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma, Vet Pathol. 2011 Jan;48(1):41-53.
- Bergman PJ, Canine Oral Melanoma, Clin Tech Small Anim Pract. 2007 May;22(2):55-60
- Bongiovanni, L. et al. 2015. "Canine Cutaneous Melanocytic Tumours: Significance of Beta-Catenin and Survivin Immunohistochemical Expression." Veterinary Dermatology 26(4):1–10.
- Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, Barnhill RL, Busam KJ, Cochran AJ, Cook MG, Elder DE, McCarthy SW, Mihm MC, Schadendorf D, Scolyer RA, Spatz A, Bastian BC. Genetic and morphologic features for melanoma classification. Pigment Cell Melanoma Res. 2010;23(6):763-70.
- Gershenwald, J. E., & Guy, G. P. (2015). Stemming the rising incidence of melanoma: Calling prevention to action. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 108(1)
- Gillard M, Cadieu E, De Brito C, Abadie J, Vergier B, Devauchelle P, Degorce F, Dréano S, Primot A, Dorso L, Lagadic M, Galibert F, Hédan B, Galibert MD, André C. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. Pigment Cell Melanoma Res. 2014 Jan;27(1):90-102.
- Gillard, M., Cadieu, E., De Brito, C., Abadie, J., Vergier, B., Devauchelle, et al. 2014). Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. Pigment Cell and Melanoma Research, 27(1), 90–102.
- Gomes, J. et al. 2012. "Study of c-Kit Immunoexpression in Canine Cutaneous Melanocytic Tumors." Melanoma research 22(3): 195–201.
- Greenwald HS, Friedman EB, Osman I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. Melanoma Res. 2012 Feb;22(1):1-8.
- Gross, T.L. et al. 2005. Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd Edition. Blackwell Science, Oxford.
- Han JI. Et al Dysregulation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in canine cutaneous melanotic tumor 2010 Vet Pathol. 2010 Mar;47(2):285-91
- Iussich S, Maniscalco L, Di Sciuva A, Iotti B, Morello E, Martano M, Gattino F, Buracco P, De Maria R., PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis, Vet Comp Oncol. 2016
- Jubb and Kennedy Palmer's, Pathology of Domestic Animals, 6° ed, Elsevier, 2016
- Lacroux, C. et al. 2012. "Study of Canine Cutaneous Melanocytic Tumours : Evaluation of Histological and Immunohistochemical Prognostic Criteria in 65 Cases." Revue de Médecine Vétérinaire 163(8-9): 393–401.
- Laprie, C. et al. 2001. "MIB-1 Immunoreactivity Correlates with Biologic Behaviour in Canine Cutaneous Melanoma." Veterinary dermatology 12(3): 139–47.
- lllvan der Weyden, L., Patton, E. E., Wood, G. A., Foote, A. K., Brenn, T., Arends, M.

J., & Adams, D. J. (2016). Cross-species models of human melanoma. The Journal of Pathology, 238(2), 152–65.
– Mihajlovic M, Vlajkovic S, Jovanovic P, Stefanovic V. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. Int J Clin Exp Pathol. 2012;5(8):739-53.
– Newman SJ1, Jankovsky JM, Rohrbach BW, LeBlanc AK. C-kit expression in canine mucosal melanomas, Vet Pathol, 49(5) 760-765 (2012
– Murakami A., Mori T, Sakai H, Murakami M, Yanai T, Hoshino Y, Maruo K. Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. Vet Comp Oncol. 2011 Sep;9(3):219-24
– Nishiya, A., Massoco, C., Felizzola, C., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M., … Zaidan Dagli, M. (2016). Comparative Aspects of Canine Melanoma. Veterinary Sciences, 3(1), 7. http://doi.org/10.3390/vetsci3010007
– Riccardo F, Iussich S, Maniscalco L., Lordamayayo S, La Cosa G, Arigoni M, Demaria R, Gattino F, Lanzardo S, Lardone E, Martano M, Morello E, Prestigio S, Fiore A, Quaglino E, Zabarino S, Ferrone S, Buracco P, Cavallo F. Clin cancer res 2014 20,3753-3762
– Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanomapatient care. Mol Oncol. 2011;5(2):124-36
– Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, Webster JD, Prasad ML, Conway CM, Prieto VM, Gary JM, Goldschmidt MH, Esplin DG, Smedley RC, Piris A, Meuten DJ, Kiupel M, Lee CC, Ward JM, Dwyer JE, Davis BJ, Anver MR, Molinolo AA, Hoover SB, Rodriguez-Canales J, Hewitt SM. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2014;27(1):37-47
– Smedley R. C., W. L. Spangler, D. G. Esplin, B. E. Kitchell,P. J. Bergman, H.-Y. Ho, I. L. Bergin, and M. Kiupel, Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation, Vet Pathol. 2011 Jan;48(1):54-72.
– Smedley, R.C. et al. 2011. "Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation." Veterinary pathology 48(1): 54–72.
– Smith, S. H., Goldschmidt, M. H., & McManus, P. M. (2002). A comparative review of melanocytic neoplasms. Veterinary Pathology, 39(6), 651–78.
– Spangler W. L. and P. H. Kass, The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia, Vet Pathol 43:136–149 (2006).
– Sulaimon, S. S., & Kitchell, B. E. (2003). The biology of melanocytes. Veterinary Dermatology,14(2),57–65

IL RUOLO DEI PAPILLOMAVIRUS BOVINI IN ONCOLOGIA COMPARATA

SANTE ROPERTO, FRANCO ROPERTO

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Filogenesi e tassonomia

I Papillomavirus (PVs), scoperti all'inizio dello scorso secolo, sono una famiglia di virus oncogeni a DNA, ampiamente distribuiti in natura, con spiccato tropismo per gli epiteli cutanei e delle mucose, e in grado di infettare uomo e animali domestici e selvatici (IARC, 2007; Moody e Laimins, 2010).

I papillomavirus appartengono alla famiglia *Papillomaviridae* (de Villiers *et al*., 2004), suddivisa in 39 'Generi', identificati mediante lettere dell'alfabeto greco. In base alle proprietà biologiche e all'organizzazione del genoma, ogni genere riconosce una o più specie, nelle quali sono raggruppati tipi, sottotipi e varianti del virus.

La maggior parte dei papillomavirus appartiene al microbiota cutaneo, il che giustifica il motivo per il quale i papillomavirus si rendono responsabili di lesioni neoplastiche e non prevalentemente a carico della cute. Tuttavia sono ben note localizzazioni di papillomavirus in altre sedi quali apparato gastrointestinale e urogenitale. Sono virus generalmente specie-specifici a eccezione dei Deltapapillomavirus bovini.

Organizzazione genomica

Un Papillomavirus è costituito da un capside proteico icosaedrico di 55nm di diametro che racchiude una molecola circolare di DNA a doppia elica, formata da circa 8000 coppie di basi. L'organizzazione genomica, simile per tutti i papillomavirus, contiene otto "open reading frames" (ORFs) o moduli di lettura aperti che vengono trascritti come messaggeri utilizzando come stampo sempre lo stesso filamento di DNA. Ciascun ORF è capace di codificare per uno specifico mRNA e relativa proteina.

Fig. 1. Tumore uroteliale papillare multifocale. Evidente la proliferazione delle lesioni neoplastiche sulla mucosa della vescica

Fig. 2. Tumore uroteliale invasivo accompagnato da una flogosi purulenta

Il genoma di tutti i tipi di papillomavirus è essenzialmente diviso in tre regioni:

- E (Early): regione composta da geni che costituiscono il 45% del genoma virale e che codificano per proteine precoci (Early), suddivisa in 6 ORFs: E1, E2, E3, E4, E5, E6 ed E7. Queste proteine sono coinvolte in processi di replicazione, trascrizione e trasformazione cellulare.
- L (Late): è una regione molto conservata che codifica per proteine tardive (Late), suddivisa in 2 ORFs (open-reading frames): L1 (proteina capsidica maggiore) e L2 (proteina capsidica minore). Questa regione rappresenta circa il 40% dell'intero DNA virale, e codifica per le proteine strutturali del capside virale, capaci quindi di evocare la risposta immunitaria da parte dell'ospite.
- LCR (Long-Control-Region) o URR (upstream regulatory region): regione non codificante (cioè non possiede capacità trascrizionale autonoma), priva di ORFs e che rappresenta il 7-10% del genoma virale con un peso molecolare che varia da 400 a 1000 paia di basi; è posizionata tra la fine del gene codificante L1 e l'inizio del gene per E6.

I Papillomavirus bovini (BPVs)

I Papillomavirus bovini sono tra i virus animali più studiati, in medicina comparata, sia per il loro potenziale legame diretto tra infezione virale e neoplasie sia perché, per alcuni di essi, è stato ampiamente documentato il "salto" di specie, ovvero la possibilità di infettare numerose altre specie animali. A tutt'oggi sono noti ventuno genotipi virali (http://pave.niaid.nih.gov) raggruppati in quattro generi:

- Deltapapillomavirus (δPVs) a cui appartengono il BPV-1, il BPV-2, il BPV-13 ed il BPV-14;
- Epsilonpapillomavirus (εPVs) a cui appartengono il BPV-5 e il BPV-8;
- Xipapillomavirus (χPVs) a cui appartengono il BPV-3, il BPV-4, il BPV-6, il BPV-9, il BPV-10, il BPV-11, il BPV-12, BPV-15, BPV-17 e BPV-20.
- Dyoxipapillomavirus (DyoχPVs) a cui appartiene il BPV-7, di cui recentemente sono state descritte diverse varianti anche in Italia (Savini *et al*., 2016), il BPV-16 e BPV-18.

I BPV-19 e il BPV-21 non sono stati ancora assegnati ad alcun genere.

I papillomavirus bovini, di cui sono note le co-infezioni con virus dello stesso genere e/o anche di generi differenti (da Silva *et al*., 2016; Santos *et al*., 2016; Savini *et al*., 2016), sono gli agenti causali di papillomi e di fibropapillomi cutanei che, soprattutto in giovani soggetti con un sistema immunitario in normale omeostasi, tendono a regredire spontaneamente. Ne residua un'efficace immunità acquisita nei confronti di epitopi antigenici che tende a salvaguardare gli animali stessi da successive infezioni da papillomavirus. Tuttavia, quando queste lesioni si localizzano in sedi quali cute della mammella, capezzolo e mucosa buccale

o a livello del prepuzio e del glande del pene, possono interferire con la normale funzione di questi organi (difficoltà nella mungitura, nella attività prensile degli alimenti, nell'attività riproduttiva) con conseguenti gravi ripercussioni nell'allevamento.

Più raramente, lesioni papillomatose benigne possono progredire in lesioni maligne. È il caso dei papillomi a cellule squamose dell'esofago associati a BPV-4 che possono progredire in carcinomi squamosi. Tale patologia è piuttosto diffusa in bovini allevati allo stato brado e semibrado in prossimità di terreni ricchi in felce (*Pteridium aquilinum*). La felce, infatti, contiene numerose sostanze tossiche per lo più ad azione clastogena (rottura del DNA cromosomiale), mutagena e oncogena che sembrano potenziare il potere patogeno dei papillomavirus.

Una recente indagine epidemiologica condotta su oltre 1000 bovini, allevati allo stato brado su terreni contaminati da felce o alimentati con fieno contenente questa pianta tossica e regolarmente macellati, ha evidenziato lesioni neoplastiche esofagee, da cui è stato amplificato il DNA del BPV-4, in circa il 13% degli animali esaminati (Borzacchiello *et al*., 2003).

Anche nell'uomo il carcinoma a cellule squamose dell'esofago viene attribuito all'azione combinata di alcuni papillomavirus, quali HPV-16 e HPV-18 conosciuti come "high-risk" virus perchè responsabili anche del tumore della cervice della donna, e sostanze della felce con cui l'uomo può venire a contatto attraverso il latte di animali contaminati da questa pianta, l'acqua o attraverso l'inspirazione delle spore (Syrjänen, 2006).

I papillomavirus bovini che sono considerati i corrispettivi dei papillomavirus umani "high-risk" (alto rischio) sono i Deltapapillomavirus. Allo stato attuale delle conoscenze, i quattro virus appartenenti a questo genere sono gli unici che hanno un tropismo sia per cellule epiteliali sia mesenchimali, nelle quali esprimono il loro potere trasformante. Sono inoltre i soli di cui è stata documentata la trasmissione in altre specie animali (*trans-species transmission*).

I Deltapapillomavirus sono responsabili di fibropapillomi cutanei in bovini, bufali, zebre, giraffe e antilopi. Inoltre sono agenti infettivi associati a sarcoidi equini e felini, nei quali si ritiene che l'infezione virale giochi un ruolo principale nel determinismo di tali tumori. Poiché il BPV-14 è stato riscontrato in associazione con il sarcoide in leoni africani alimentati con carcasse bovine affette da fibropapillomi cutanei, è stata anche avanzata l'ipotesi del coinvolgimento della via alimentare nelle modalità di trasmissione di questi virus (Orbell *et al*., 2011). Tutti i deltapapillomavirus, in particolare BPV-2, BPV-13 e BPV-14, sono i principali agenti infettivi coinvolti nella carcinogenesi vescicale in bovini e bufali (Campo *et al*., 1992; Roperto *et al*., 2013; Roperto *et al*., 2015; Roperto *et al*., 2016).

I deltapapillomavirus esprimono il loro potenziale oncogeno attraverso l'oncoproteina E5, a differenza degli altri papillomavirus di interesse umano e veterinario il cui potere trasformante è legato principalmente alle oncoproteine E6 ed E7. L'E5 sembra agire in sinergia con lo ptaquiloside (PT), un sesquiterpenoide della felce, il che giustificherebbe il motivo perché questi tipi di tumori si riscontrano prevalentemente in animali allevati su o in prossimità di terreni ricchi in felce.

I tumori della vescica, infatti, sono molto rari nei ruminanti e rappresentano lo 0,01% di tutti i tumori maligni di queste specie (Meuten, 2002). Invece sono molto comuni in bovini e bufali il cui tipo di allevamento (stato brado e/o semibrado) favorisce l'ingestione di sostanze tossiche contenute nella felce tra cui, appunto, ptaquiloside. Questo sesquiterpenoide, eliminato attraverso il rene, viene attivato dal pH basico delle urine dei ruminanti. La sua attivazione causa una mutazione in un normale gene della famiglia RAS che così diviene un oncogène, un gene capace, unitamente ad altri fattori (eziologia multifattoriale dei tumori), di trasformare la cellula in senso tumorale.

I deltapapillomavirus causano sia tumori epiteliali che mesenchimali nella vescica dei grossi ruminanti che si accompagnano a una sindrome clinica nota come Ematuria cronica enzootica per la presenza di sangue nelle urine e a severe condizioni tossiemiche con gravi ripercus-

sioni negative sulle attività produttive degli animali (riduzione del peso corporeo, riduzione della secrezione lattea, patologie regressive a carico degli organi interni, ecc). In particolare i tumori uroteliali della vescica bovina stanno assumendo un'importanza notevole in medicina comparata grazie alle strette analogie morfologiche e biomolecolari che questi tumori presentano con i corrispettivi umani. Ci sono tuttavia significative differenze circa il comportamento biologico nelle due specie. I tumori uroteliali della vescica dell'uomo infatti hanno un potenziale metastatico molto più elevato rispetto a quello dei tumori uroteliali del bovino. In quest'ultima specie l'8-10% dei tumori uroteliali riesce a metastatizzare soprattutto nei linfonodi regionali e meno frequentemente in organi distanti (Pamukcu *et al*., 1976; Roperto *et al*., 2010).

In considerazione della stretta somiglianza del fenotipo cellulare, per i tumori uroteliali bovini è stata proposta e utilizzata (Roperto *et al*., 2010) la stessa classificazione morfologica dei tumori uroteliali dell'uomo (WHO, 2004). In questo contesto, le principali lesioni pre- e neoplastiche della vescica bovina associate a infezione da deltapapillomavirus possono essere classificate in:

a) lesioni uroteliali piatte (Tab. 1),
b) lesioni uroteliali papillari (Tab. 2),
c) lesioni endofitiche e uroteliali invasive (Tab. 3).

I tumori invasivi (Fig. 2) sono tumori infiltranti che superano la membrana basale. La maggior parte dei tumori invasivi dei bovini hanno una morfologia microscopica da carcinoma ad alto grado di malignità (Roperto *et al*., 2010). Tuttavia, a differenza dei tumori invasivi dell'uomo che metastatizzano in elevate percentuali, i tumori uroteliali infiltranti dei bovini solo raramente metastatizzano prediligendo i linfonodi regionali.

Nel bovino sono state riportate numerose varianti istologiche di carcinomi uroteliali quali carcinomi sarcomatoidi, carcinomi a cellule lipidiche, carcinomi lymphoepithelioma-like, carcinomi con differenziazione neuroendocrina, così definite per la propensione delle cellule uroteliali neoplastiche a differenziarsi e assumere caratteristiche fenotipiche diverse dalle cellule di transizione tipiche della mucosa della vescica. In tutte queste lesioni è stato amplificato il DNA di deltapapillomavirus (Roperto *et al*., 2010).

Infine, l'infezione da deltapapillomavirus porta frequentemente anche alla formazione di tumori mesenchimali della vescica. Questa condizione è marcatamente differente da quella che si verifica nella carcinogenesi vescicale dell'uomo, specie in cui sono piuttosto rari i tumori mesenchimali della vescica. Nella vescica di bovini sono stati descritti angiomi, linfangiomi, emangioendoteliomi, emangiopericitomi, leiomiomi e leiomiosarcomi, rabdomiomi e rabdomiosarcomi. I più frequenti tumori mesenchimali tuttavia, appaiono essere gli angiosarcomi (oltre il 20%) (Martano *et al*., 2013).

Il più frequente meccanismo molecolare alla base della carcinogenesi vescicale in bovini e bufali vede l'oncoproteina E5 dei deltapapillomavirus agire mediante il recettore β (βR) del fattore di crescita conosciuto come Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Borzacchiello *et al*., 2007; Roperto *et al*., 2013). La fosforilazione di questo fattore porta alla produzione di proteine che contribuiscono alla trasformazione cellulare.

I papillomavirus sono per definizione, come già detto, virus oncogeni. Tuttavia recentemente è stata documentata l'infezione produttiva di alcuni deltapapillomavirus nei linfociti CD4 e CD8 circolanti e nella placenta di bovini associata a eventi non neoplastici (Roperto *et al*., 2011; Roperto *et al*., 2012). È verosimile che il virus usi le cellule del sangue come vettori attivi, nelle quali replica dando origine a nuove entità virali che hanno così la potenzialità di raggiungere e infettare molti altri organi. In questo contesto, la presenza del virus documentata in trofoblasti può essere il *marker* di un'infezione attiva a carico della placenta che può esitare in disordini riproduttivi. Pertanto, l'infezione della placenta a opera dei papillomavirus rappresenta un'ulteriore patologia nella specie bovina e bufalina, finora praticamente sconosciuta, che può interferire con la fertilità.

Tab. 1. Lesioni uroteliali piatte

Lesioni uroteliali piatte senza atipia
Iperplasia
Lesioni uroteliali piatte con atipia
Atipia reattiva
Atipia di significato sconosciuto
Displasia (neoplasia intrauroteliale di basso grado)
Carcinoma *in situ* (neoplasia intrauroteliale di alto grado)

Di particolare interesse è il carcinoma *in situ (CIS)* che per definizione è una lesione piatta dell'urotelio composta da cellule maligne (Sesterhenn, 2004). Il CIS *de novo* (primario) rappresenta circa il 4% dei tumori maligni uroteliali nel bovino; accompagna altresì in percentuali elevatissime (80-90%) i tumori maligni papillari e invasivi, il che fa pensare che, come nei tumori uroteliali umani, anche nel bovino il CIS progredisce in tumori endopapillari e/o in tumori infiltranti.

Tab. 2. Lesioni uroteliali papillari

Iperplasia papillare
Papilloma
Tumore papillare uroteliale a basso potenziale di malignità (PUNLMP = papillary urothelial neoplasm of low malignant potential)
Carcinoma papillare a basso grado di malignità (low-grade)
Carcinoma papillare ad alto grado di malignità (high-grade)

I tumori papillari (Fig. 1), uni- e multifocali, sono i più comuni tumori uroteliali del bovino; in particolare, il carcinoma endopapillare a basso grado di malignità, che frequentemente manifesta una accrescimento endoluminale senza infiltrazione della lamina propria, è molto più frequente del carcinoma papillare ad alto grado di malignità che invece tende a infiltrare la lamina propria.

Tab. 3. Lesioni endofitiche e uroteliali invasive

Papilloma endofitico o ad accrescimento invertito
Carcinoma invasivo a basso grado di malignità (low-grade)
Carcinoma invasivo ad alto grado di malignità (high-grade)
Varianti istologiche dei carcinomi invasivi

Bibliografia

- Borzacchiello G., Ambrosio V., Roperto S., Poggiali F., Tsirimonakis E., Venuti A., Campo M.S., Roperto F. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the South of Italy. J. Comp. Pathol. 128, 203-206, 2003.
- Campo M.S., Jarrett W. F.H., Barron R., O'Neil B.W., Smith K.T. Association of bovine Papillomavirus Type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. Cancer Res. 52, 6898-6904, 1992.
- da Silva F.R., Cibulski S.P., Daudt C., Weber M.N., Guimarães L.L., Streck A.F., Mayer F.Q., Roehe P.M., Canal C.W. Novel bovine papillomavirus type discovered by rolling-circle amplification coupled with next-generation sequencing. PLoS One 11(9):e0162345, 2016.
- de Villiers E-M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H-U., zur Hausen H. Classification of papillomavirus. Virology 324,17-27, 2004.
- International Agency for Cancer Research (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses 2007, vol. 90. Lyon: IARC Press.
- Martano M., Roperto F., de Cassia Stocco R., Russo V., Borzacchiello G., Paciello O., Iovane V., Leonardi L., Maiolino P., Restucci B., Papparella S., Roperto S. Bovine papillomavirus type 2 infection and a series of mesenchymal tumors of the urinary bladder in cattle. Biomed. Res. Int. 2013:814635. doi: 10.1155/2013/814635.
- Meuten D.J. Tumors in Domestic Animals. DJ Meuten Ed, Iowa State Press, Ames, pp 524-546, 2002.
- Moody C.A. & Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat. Rev. Cancer 10, 550-560, 2010.
- Orbell G.M.B., Young S., Munday J.S. Cutaneous sarcoids in captive African lions associated with feline sarcoid-associated papillomavirus infection. Vet. Pathol. 48, 1176-1179, 2011.
- Pamukcu A.M., Price J.M., Bryan G.T. Naturally occurring and bracken fern-induced bovine urinary bladder tumors. Vet. Pathol. 13, 110-122, 1976.
- Roperto S., Borzacchiello G., Brun R., Leonardi L., Maiolino P., Martano M., Paciello O., Papparella S., Restucci B., Russo V., Salvatore G., Urraro C., Roperto F. A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. J. Comp. Pathol. 142, 95-108, 2010.
- Roperto S., Borzacchiello G., Esposito I., Riccardi M., Urraro C., Lucà R., Corteggio A., Tatè R., Cermola M., Paciello O., Roperto F. Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors. PLoS One 7(3):e33569, 2012.
- Roperto S., Comazzi S., Ciusani E., Paolini F., Borzacchiello G., Esposito I., Lucà R., Russo V., Urraro C., Venuti A., Roperto F. PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papilloma virus type 2. J. Gen. Virol. 92,1787-1794, 2011.
- Roperto S., Munday J.S., Corrado F., Goria M., Roperto F. Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. Vet. Microbiol. 190,1-4, 2016.
- Roperto S., Russo V., Leonardi L., Martano M., Corrado F., Riccardi M.G., Roperto F. Bovine Papillomavirus Type 13 Expression in the Urothelial Bladder Tumours of Cattle. Transbound. Emerg. Dis. 63, 628-634, 2016.
- Roperto S., Russo V., Ozkul A., Sepici-Dincel A., Maiolino P., Borzacchiello G., Marcus I., Esposito I., Riccardi M.G. and Roperto F. Bovine papillomavirus type 2 infects the urinary bladder of water buffalo (Bubalus bubalis) and plays a crucial role in bubaline urothelial carcinogenesis. J. Gen. Virol. 94, 403-408, 2013.
- Santos E.U., Silva M.A., Pontes N.E., Coutinho L.C., Paiva S.S., Castro R.S., Freitas A.C. Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. Transbound. Emerg. Dis. 63:e103-108, 2016.

- Savini F., Gallina L., Alberti A., Müller M., Scagliarini A. Bovine papillomavirus type 7 in Italy: complete genomes and sequence variants. Virus Genes 52, 53-60, 2016.
- Savini F., Mancini S., Gallina L., Donati G., Casà G., Peli A., Scagliarini A. Bovine papillomatosis: First detection of bovine papillomavirus types 6, 7, 8, 10 and 12 in Italian cattle herds. Vet. J. 210, 82-84, 2016.
- Sesterhenn I.A. Urothelial carcinoma in situ. In: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, J.N. Eble, G Sauter, J.I. Epstein, I.A. Sesterhenn, Eds, IARC Press, Lyon, pp 119-120, 2004.
- Syrjänen K. HPV and oesophageal carcinoma. In: *Papillomavirus Research - from natural history to vaccine and beyond*. Campo M.S., Ed, Caister Academic Press, Norfolk, England, pp 229- 254, 2006.

CARCINOMA A CELLULE SQUAMOSE DEL GATTO: MODELLO DI CANCEROGENESI SPONTANEA PER IL CARCINOMA TESTA-COLLO DELL'UOMO

GIUSEPPE BORZACCHIELLO, GENNARO ALTAMURA

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni animali, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

"Un modello è una bugia che aiuta a vedere la verità"
H. Skipper

Introduzione

Il tumore testa-collo è il sesto tumore più frequente, rappresentando il 5% di tutte le neoplasie dell'uomo (Ferlay *et al*., 2008). In Italia ogni anno si diagnosticano circa 12.000 nuovi casi, con un tasso d'incidenza pari a 16 casi per 100.000 italiani (Licitra *et al*., 2015). Il tumore testa-collo consiste di un gruppo piuttosto eterogeneo di neoplasie che originano da vari distretti corporei: labbra, cavo orale, orofaringe, ipofaringe, lingua, laringe, tratto nasosinusale. Solo il 50% dei pazienti affetti da questo tumore sopravvive a 5 anni dalla diagnosi e la prognosi, in pazienti con metastasi o invasione ossea, è generalmente infausta (Jimi *et al*., 2013). Sono più colpiti i soggetti di sesso maschile, e la maggiore frequenza si riscontra nella fascia d'età compresa tra i 50 e i 70 anni. Il 90% dei tumori maligni del distretto testa-collo è rappresentato da carcinomi squamocellulari a vario grado di differenziazione.

Diversi modelli animali sono utilizzati per lo studio del carcinoma testa-collo dell'uomo, tra questi i modelli murini ortotopici o transgenici e l'hamster. Tuttavia, considerato lo scarso livello predittivo dovuto a limiti intrinseci dei modelli stessi, è necessario integrare le informazioni ricavate con un modello animale di cancerogenesi spontanea. Da numerose ricerche svolte negli ultimi anni emerge che il carcinoma squamocellulare del distretto testa-collo del gatto è per molti aspetti simile all'analoga neoplasia umana (Supsavhad *et al*., 2016). Pertanto, il tumore testa-collo felino rappresenta un nuovo e alternativo modello animale per lo stu-

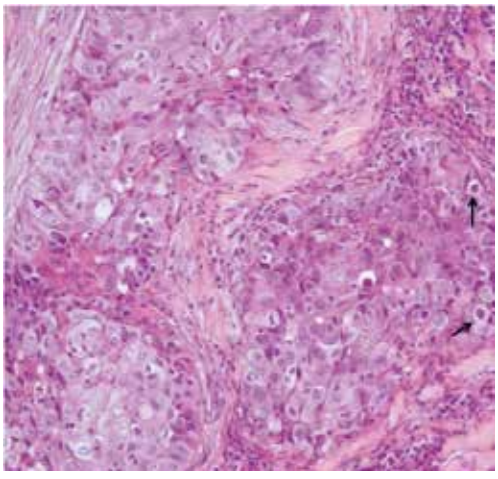


Fig. 1. Gatto. Carcinoma squamocellulare in sede gengivale. Nidi di cellule neoplastiche a differenziazione squamosa invadono il tessuto sottostante. Le frecce indicano la presenza di coilociti con alone perinucleare chiaro, aspetto tipico dell'infezione da papilloma virus (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 20x)

dio di aspetti traslazionali riguardanti l'eziologia e la ricerca di nuove strategie terapeutiche per il carcinoma testa-collo dell'uomo.

Aspetti eziopatogenetici comparativi

Il 75% dei tumori del distretto testa-collo è correlato al fumo e al consumo di alcool, mentre circa il 25% è correlato a infezione da papillomavirus umano di tipo 16 (HPV-16); meno frequentemente si riscontra il genotipo 18 (HPV-18). Mentre la prima sottocategoria è in diminuzione grazie anche al ridotto consumo di tabacco (sigarette, pipe, sigari), si registra un aumento, soprattutto nella popolazione giovanile, dei tumori testa-collo HPV associati. La cancerogenesi da HPV classicamente si esplica attraverso l'azione degli oncogeni virali E6 ed E7. E6 si lega a p53 inducendone la degradazione e dunque inibendo l'apoptosi, E7 deregola la proteina del retinoblastoma (pRb), attivando fattori trascrizionali coinvolti nella proliferazione cellulare, con conseguente accumulo della proteina p16CDKN2A (p16). Generalmente, i pazienti affetti da tumori testa-collo HPV positivi rispondono meglio alle terapie, hanno una prognosi migliore e una minore tendenza a sviluppare recidive rispetto a quelli HPV negativi. Per quanto al momento il tumore testa-collo HPV positivo appare come una sottocategoria, non è ancora ben chiaro il significato della coesistenza di neoplasie HPV positive in soggetti fumatori e con anamnesi di abuso di alcool.

Il carcinoma squamocellulare orale felino è molto simile a quello dell'uomo (tab. 1). Il 75% circa delle neoplasie maligne che insorgono nel cavo orale del gatto sono carcinomi squamocellulari (fig.1) e, come nell'uomo, si rileva una localizzazione prevalente in corri-

Fattori di rischio	Esposizione diretta e indiretta al fumo di tabacco Infezione da papillomavirus
Presentazione clinica	Distretto cervico-facciale Invasione ossea Metastasi linfonodali Ricorrenza della malattia
Aspetto istopatologico	Carcinoma a cellule squamose
Patologia cellulare e molecolare	Alterazione TP53 Attivazione EGFR e risposta al Gefitinib Neoangiogenesi tumorale ed espressione di VEGF Espressione di COX-2 e risposta al Piroxicam Invasione ossea mediata da PTHrP e RANK Espressione degli oncogeni virali E6 ed E7 Accumulo della proteina p16

Tab. 1. Analogie tra il tumore testa-collo umano e felino

spondenza della lingua. Anche la biologia del tumore felino è molto simile a quella del tumore umano. Infatti, le sedi d'insorgenza, la frequenza di metastasi, l'invasione del tessuto osseo e la ricorrenza della malattia dopo la terapia sono comparabili all'uomo (Soltero-Rivera *et al*., 2014). Tra i possibili fattori di rischio si considera, come nell'uomo, l'esposizione indiretta al fumo di tabacco e il consumo di cibo in scatola, principalmente tonno (Bertone *et al*., 2003).

Il ruolo del papillomavirus felino (FcaPV) nell'eziopatogenesi del carcinoma squamocellulare del gatto oggi emerge in maniera incontrovertibile. Diversi genotipi di FcaPVs sono associati alle neoplasie squamocellulari della cute e della mucosa orale felina, sebbene il contributo dei diversi virus alla cancerogenesi non è ancora del tutto definito. Tuttavia, per quanto riguarda il papillomavirus felino di tipo 2 (FcaPV-2), è stato dimostrato recentemente che, così come nell'uomo, contribuisce alla cancerogenesi attraverso l'azione degli oncogeni E6 ed E7 che sono trascrizionalmente attivi in vivo (tab. 1). Inoltre, E6 di FcaPV-2 lega e degrada p53 alterando i meccanismi fisiologici dell'apoptosi, mentre E7, legandosi a pRb e inducendone la degradazione, attiva fattori trascrizionali che favoriscono la proliferazione cellulare incontrollata (Altamura *et al*., 2016). Coerentemente, come nella controparte umana, si riscontra anche un accumulo di p16 nei carcinomi squamocellulari del gatto (Munday *et al*., 2013). I dati ottenuti in vitro nel modello felino rispecchiano lo spettro delle alterazioni molecolari riscontrate in vivo, suggerendo dunque che FcaPV-2 promuove la cancerogenesi così come HPV-16 nel carcinoma del distretto cervico-facciale dell'uomo.

Aspetti di patologia comparata

Molti sono gli aspetti di patologia molecolare e cellulare che accomunano il carcinoma testa-collo dell'uomo e quello felino.

TP53 è un gene oncosoppressore che svolge un importante ruolo nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Questo gene risulta mutato in molti carcinomi testa-collo dell'uomo alcool e fumo indotti, mentre nella sottocategoria associata ad HPV, p53 è deregolata (Sano *et al*., 2011; TCGA Network, 2015) così come in una proporzione di tumori felini. Inoltre in entrambe le specie p16 è frequentemente iper-espressa contribuendo alla progressione tumorale (Munday *et al*., 2013; Sritippho *et al*., 2016).

Il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) è un recettore ad attività tirosinchinasi frequentemente coinvolto nell'eziopatogenesi di diverse neoplasie dell'uomo e tra queste il carcinoma testa-collo, rappresentando un valido target terapeutico (Kalyankrishna *et al*., 2006). Nell'analoga neoplasia felina si riscontrano elevati livelli d'espressione di EGFR (Rathore *et al*., 2014), e il gefitinib, inibitore specifico del recettore, ha dimostrato uguale efficacia nell'uomo e nel gatto nel ridurre la proliferazione cellulare, sebbene in entrambe le specie è possibile osservare resistenza al farmaco (Pang *et al*., 2012). A differenza della controparte umana, l'elevata espressione di EGFR nel gatto non appare correlata all'espressione di FcaPV-2 E6 ed E7 (osservazioni personali).

Nel tumore testa-collo dell'uomo si rileva neoangiogenesi caratterizzata da aumentata densità microvascolare ed elevati livelli d'espressione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). Questo particolare aspetto di patologia neoplastica si riscontra anche nelle neoplasie feline in cui si registra un'elevata espressione di VEGF e una maggiore densità microvascolare rispetto al tessuto normale (Wypij *et al*., 2008; Millanta *et al*., 2016).

La ciclossigenasi–2 (COX-2) è un'enzima che gioca un ruolo importante nella cancerogenesi regolando tra l'altro diversi aspetti della neoangiogenesi. Un'elevata espressione di COX-2 è riportata nel tumore testa-collo umano e felino, e in entrambe le specie il piroxicam, un COX-2 inibitore, insieme al masitinib riducono in maniera significativa la proliferazione cellulare (Celenk *et al*., 2013; Rathore *et al*., 2014; Millanta *et al*., 2016).

Il carcinoma testa-collo dell'uomo e del gatto sono neoplasie altamente invasive frequentemente caratterizzate da osteolisi maligna dell'osso sottostante. Tale fenomeno in entrambe le specie è principalmente dovuto all'attivazione degli osteoclasti da parte del peptide correlato al paratormone (PTHrP) che induce un'aumentata espressione della proteina RANKL (Martin *et al*., 2012).

Conclusioni

Il carcinoma testa-collo è, come tutte le neoplasie, una patologia complessa a eziologia multifattoriale. Al momento nessun modello animale è in grado di riprodurne fedelmente la biologia. Tuttavia sono stati compiuti molti passi in avanti nella comprensione dell'eziopatogenesi e delle caratteristiche biologiche e patologiche di questa neoplasia, ma molto rimane ancora da capire.

Le notevoli similitudini tra il carcinoma testa-collo dell'uomo e del gatto fanno di quest'ultimo il candidato naturale quale modello di cancerogenesi spontanea, ponendosi attualmente sulla frontiera più avanzata delle conoscenze dei meccanismi eziopatogenetici e della ricerca di nuovi mezzi terapeutici sia per il gatto sia per l'uomo.

Bibliografia

- Altamura G., Corteggio A., Pacini L., Conte A., Pierantoni GM., Tommasino M., Accardi R., Borzacchiello G., Transforming properties of Felis catus papillomavirus type 2 E6 and E7 putative oncogenes in vitro and their transcriptional activity in feline squamous cell carcinoma in vivo, Virology 2016, *496,* 1-8.
- Bertone E.R., Snyder L.A., Moore A.S., Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats, J. Vet. Int. Med. 2003, *17*, 557-562.
- Celenk F., Bayramoglu I., Yilmaz A., Menevse A., Bayazit Y., Expression of cyclooxygenase-2, 12-lipoxygenase, and inducible nitric oxide synthase in head and neck squamous cell carcinoma**,** J. Craniofac. Surg. 2013, *24*, 1114-1117.
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, Int. J. Cancer. 2010, *127,* 2893-2917
- Jimi E., Shin M., Furuta H., Tada Y., Kusukawa J., The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma. Int. J. Onc. 2013, *42*, 803- 809.
- Kalyankrishna S. and Grandis J.R., Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer, J. Clin. Oncol. 2006, *24,* 2666-2672.
- Licitra L., Baldi G., Alterio D., Bacigalupo A., Cantù G., Cerrotta A., De Sanctis V., Grandi C., Gatta G., Calareso G., Locati L., Presutti L., Sesenna E., Spriano G., Sacco G., Linee guida tumori della testa e del collo, Associazione Italiana Oncologia Medica (AIOM) 2015.
- Martin C.K., Dirkensen W.P., Shu S.T., Werbeck J.L., Thudi N.K., Yamaguchi M., Wolfe T.D., Heller K.N., Rosol T.J. Characterization of bone resorption in novel in vitro and in vivo models of oral squamous cell carcinoma, Oral Oncol. 2012, *48*, 491-499.
- Millanta F., Andreani G., Rocchigiani G., Lorenzi D., Poli A., Correlation Between Cyclo-oxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Canine and Feline Squamous Cell Carcinomas, J. Comp. Pathol. 2016, *154*, 297-303.
- Munday J.S., French A.F., Gibson I.R., Knight C.G., The presence of p16 CDKN2A protein immunostaining within feline nasal planum squamous cell carcinomas is associated with an increased survival time and the presence of papillomaviral DNA, Vet. Pathol. 2013, *50*, 269-73.
- Pang L.Y., Bergkvist G.T., Cervantes-Arias A., Yool D.A., Muirhead R., Argyle D.J., Identification of tumour initiating cells in feline head and neck squamous cell carcinoma and evidence for gefitinib induced epithelial to mesenchymal transition, Vet. J. 2012, *193*, 46-52.
- Rathore K., Alexander M., Cekanova M., Piroxicam inhibits Masitinib-induced cyclooxygenase 2 expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro, Transl. Res. 2014, *164*, 158-168.
- Sano D., Xie T.X., Ow T.J., Zhao M., Pickering C.R., Zhou G., Sandulache V.C., Wheeler D.A., Gibbs R.A., Caulin C., Myers J.N., Disruptive TP53 mutation is associated with aggressive disease characteristics in an orthotopic murine model of oral tongue cancer, Clin. Cancer Res. 2011, *17*, 6658-6670.
- Soltero-Rivera M.M., Krick E.L., Reiter A.M., Brown D.C., Lewis J.R., Prevalence of regional and distant metastasis in cats with advanced oral squamous cell carcinoma: 49 cases (2005-2011). J. Feline Med. Surg. 2014, *16*, 164-169.

– Sritippho T., Chotjumlong P., Iamaroon A., Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer, Asian Pac. J. Cancer Prev. 2015, *16*, 6193-6200.
– Supsavhad W., Dirksen W.P., Martin C.K., Rosol T.J., Animal models of head and neck squamous cell carcinoma, Vet. J. 2016, *210*, 7-16.
– The Cancer Genome Atlas (TCGA) Network, Comprehensive genome characterization of head and neck squamous cell carcinomas, Nature 2015, *517*, 576-582.
– Wypij J.M., Fan TM., Fredrickson R.L., Barger A.M., de Lorimier L.P., Charney S.C., In vivo and in vitro efficacy of zoledronate for treating oral squamous cell carcinoma in cats, J. Vet. Int. Med. 2008, *22*, 158-163.

IL SEMINOMA DEL CANE COME MODELLO DI STUDIO DEI SEMINOMI UMANI

VALERIA GRIECO, BARBARA BANCO

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Premessa

Da circa quarant'anni, nella specie umana, si assiste a un progressivo aumento dell'ipofertilità maschile e a un incremento dell'incidenza dei tumori testicolari, in particolare dei seminomi (Brown *et al*., 1986; Carlsen *et al*., 1995; Swan *et al*., 2000). Studi recenti hanno dimostrato che queste condizioni patologiche possono essere tra loro correlate e numerose sono le ricerche che ne studiano gli aspetti eziopatogenetici e curativi (Main *et al*., 2006; Sharpe, 2006). Da queste ricerche sono emerse nuove conoscenze assai rilevanti che meriterebbero studi approfonditi su modelli animali. In particolare sembra che il seminoma derivi da lesioni testicolari di tipo macro o micro-disgenetico, già presenti alla nascita (Rajpert-De Meyts, 2006, Trabert *et al*., 2016). Non è a tutt'oggi noto come da queste lesioni predisponenti possa svilupparsi il tumore né quali possano essere i fattori che le sbloccano, iniziando l'oncogenesi. Da quanto esposto emerge l'importanza di delineare un modello animale per lo studio di queste moderne patologie che colpiscono la sfera genitale. Purtroppo, nelle specie da laboratorio quali topo e ratto, il seminoma non è un tumore spontaneo di cui si abbia notizia e, inoltre, la breve vita di queste specie non consente studi approfonditi che seguano lo sviluppo neoplastico e la sua evoluzione (Fisher *et al*., 2003). Da qui l'interesse per il cane, specie a lunga aspettativa di vita, dove i seminomi sono spontanei (Dow, 1962, Hayes e Pendergrass, 1976; Kennedy *et al*., 1998) e, al pari della medicina umana, sembrano aver subito un incremento in anni recenti (Grieco *et al*., 2008a).

Dati epidemiologici e fattori che influenzano ipofertilità maschile e sviluppo dei seminomi

Da un punto di vista epidemiologico, queste patologie sono particolarmente diffuse nel mondo occidentale (Diekmann e Pichlmeier, 2004) ma, con la globalizzazione produttiva, non è raro che vengano segnalate anche nei Paesi in via di sviluppo, in particolare ove siano presenti insediamenti industriali o colitivazioni estensive (Toppari *et al*., 1996). Richiamare questi ultimi fattori risulta importante perché, nella patogenesi di ipofertilità e tumori testicolari, sono chiamati in causa contaminanti ambientali e, in particolare, quell'ampia rosa di sostanze che va sotto il nome di interferenti endocrini (*endocrine disruptors*) (Colborn *et al*., 1993). Tali sostanze sono assai numerose ma le più rilevanti sono quelle che, come tali o durante il loro metabolismo, svolgono azione estrogeno-simile o anti-androgena andando quindi ad interferire con gli ormoni sessuali di chi ne venga a contatto o, nel caso della gestante, con il prodotto del concepimento (Tabb e Blumberg, 2006).

Tra gli interferenti endocrini ad azione estrogeno simile, ve ne sono alcuni assai noti e importanti nel passato come i pesticidi clorurati. La loro capacità di interferire con l'equilibrio ormonale, e in particolare con quello della sfera genitale, è stata dimostrata tempo fa negli animali selvatici e nell'uomo (Colborn *et al*., 1993; Sonnenshein e Soto, 1998). Pur essendo

bandito da tempo, l'uso di pesticidi clorurati può essere ancora presente nei Paesi in via di sviluppo e, inoltre, data la loro lunga permanenza nell'ambiente (Toppari *et al*., 1996) possono ancora costituire un problema, unitamente a più moderni composti quali il PCB, il cui uso fu limitato e poi bandito ma la cui presenza nell'ambiente è ancora ben documentata (Sharpe e Irvine, 2006).

Attualmente, tra i più importanti contaminanti ambientali in grado di interferire con gli ormoni sessuali maschili vi sono gli ftalati, sostanze impiegate nella produzione di moderni materiali plastici cui conferiscono flessibilità (Schettler, 2006). La contaminazione da ftalati rappresenta una reale e moderna emergenza in quanto essi si ritrovano nella composizione del packaging alimentare e nei contenitori di numerosi prodotti per l'igiene della casa e per la cura della persona. Gli ftalati dal contenitore possono venire ceduti al contenuto ed entrare così in contatto con l'organismo umano per ingestione o per via cutanea (Franz, 2005; Lottrup *et al*., 2006; Schettler, 2006).

Le sostanze ad azione estrogeno-simile e la loro azione sono particolarmente pericolose per madri gravide di figli maschi, dove queste sostanze possono andare a interferire con lo sviluppo fetale del testicolo, sia macroscopicamente che istologicamente (Sharpe *et al*., 2001; Fisher, 2004). Lo sviluppo testicolare, infatti, avviene sotto l'influsso di piccole quantità di testosterone che il feto maschio produce da sé, grazie alla precoce attività delle cellule di Leydig (Gray *et al*., 2000). Detto ciò, risulta chiaro come fasi evolutive così delicate possano venir disturbate dalla presenza di sostanze che mimino gli estrogeni e come, per l'effetto di queste, il testicolo possa andare incontro ad alterazioni di sviluppo. Tali alterazioni sono per lo più evidenziabili a livello istologico ma in alcuni casi possono accompagnarsi ad altre condizioni più eclatanti quali criptorchidismo e/o ipospadia. Per queste microlesioni malformative, associate o meno a criptorchidismo e ipospadia, è stato coniato il termine di testicular disgenesis syndrome (TDS) (Skakkebæk *et al*., 2001).

La TDS che può essere associata alla presenza di iniziali forme di seminoma, è spesso sottesa e viene scoperta casualmente quando l'uomo si sottopone ad analisi per lamentata ipofertilità o per la presenza di un aumento di volume di un testicolo (Aschim *et al*., 2007).

Correlazione tra testicular dysgenesis syndrome (TDS) e insorgenza di seminomi nella specie umana

L'azione delle sostanze estrogeno simili va ad alterare lo sviluppo della linea seminale (Sharpe, 2006). Nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, i gonociti, cellule progenitrici della linea seminale, sono localizzati a livello di sacco vitellino e, grazie alla presenza energetica di glicogeno, migrano nella gonade in formazione (Molyneaux e Wylie, 2004; Aflatoonian e Moore, 2006). Qui le cellule primordiali vengono accolte dalle cellule del Sertoli che si dispongono a raggiera, in abbozzi che costituiranno i tubuli seminiferi. Nel corso del primo trimestre di gravidanza i gonociti andranno fisiologicamente incontro alle prime fasi di sviluppo dell'epitelio seminale che, infatti, alla nascita sarà composto da prespermatogoni/spermatogoni (Gaskell *et al*., 2004). Tali cellule rimarranno poi quiescenti fino alla pubertà, quando lo sviluppo della linea seminale riprenderà e si farà presto completo (Honecker *et al*., 2004).

Le sostanze estrogeno-simili con cui la madre viene a contatto (cibo, acque contaminate, prodotti per la cura della persona) possono influire sul delicato sviluppo appena descritto e "arrestare" lo sviluppo di alcuni gonociti. La maggior parte di questi viene probabilmente eliminata, ma alcune alterazioni geniche facilitano verosimilmente l'amplificazione di segnali oncogenici che, insieme a segnali antiapoptosici, favoriscono la sopravvivenza di queste cellule germinali fetali modificate al di fuori della vita fetale (Rajpert-De Meyts, 2006). I gonociti residui non evolvono a stadi successivi, rimangono tali, all'interno di alcuni tubuli semi-

niferi che, così conformati, vengono definiti "carcinoma in situ" (CIS) (Skakkebæk, 1972). I CIS sono il maggior indicatore istologico di TDS e rappresentano il precursore del seminoma (Hustin *et al*.,1990; Damgaard *et al*., 2002; Honeker *et al*., 2004).

Da quanto esposto si nota come le ricerche svolte negli ultimi decenni abbiano contribuito a raggiungere buoni livelli di conoscenza ma, come già detto nella premessa, non è noto quali siano i meccanismi che sblocchino i CIS e vadano a iniziare la vera e propria trasformazione e proliferazione neoplastica. Ciò rappresenta forse il punto più importante su cui investigare e per il quale il delineare un modello di studio animale potrebbe essere davvero di grande aiuto.

I seminomi dell'uomo: seminoma classico e seminoma spermatocitico

Nell'uomo esistono due forme distinte di seminoma, il seminoma classico (SC) e quello spermatocitico (SS) (Mostofi e Sestehenn, 1998). La presenza di queste diverse forme è stata dimostrata su base istologica e istochimica attraverso un elegante studio di Masson (1946) a metà del secolo scorso. Negli ultimi decenni poi, con le moderne tecniche immunoistochimiche, l'esistenza di SC e SS è stata ulteriormente confermata e si sono delineati markers specifici assai utili nella diagnostica differenziale di queste due forme neoplastiche.

Da un punto di vista morfologico il SC tende a essere più monomorfo, composto da cellule di grandi dimensioni, di forma da tonda a poligonale. Tali cellule possiedono un ampio nucleo vescicoloso e sono dotate di un evidente nucleolo. Le mitosi non sono numerose e, comunque, sempre in numero minore che nella forma spermatocitica. Il SS differisce dal SC non solo per l'elevato indice mitotico ma anche per la presenza di cellule più piccole e dotate di un marcato polimorfismo, quasi a mimare quanto avviene nell'epitelio seminale. Anisocitosi e anisocariosi sono evidenti e, all'interno della neoplasia, sono presenti infiltrati linfocitari che possono essere osservati anche in caso di SC, anche se pare in maniera più contenuta (Masson, 1946; Mostofi e Sestehenn, 1998).

Il SC, come vedremo successivamente, deriva da gonociti il cui sviluppo si è arrestato durante il periodo embrionale mentre SP si sviluppa all'interno di una linea seminale normale. Il primo è tipico dei giovani mentre il secondo si sviluppa nella terza parte della vita; il primo è maligno e metastatizzante mentre il secondo generalmente mostra un comportamento biologico meno aggressivo con tendenza a estendersi localmente (Mostofi e Sestehenn, 1998).

Istochimica e immunoistochimica nella diagnosi dei seminomi umani

Quanto esposto nel precedente paragrafo, soprattutto riguardo al diverso comportamento biologico di SC e SP, fa comprendere come sia necessario in caso di seminoma poter comprendere a quale delle due forme esso appartenga.

Un primo aiuto viene dall'istochimica e, per la precisione, dalla semplice colorazione con PAS. Uno dei padri dell'istochimica, Masson, fu il primo (1946) a notare che le due forme seminomatose potevano distinguersi sulla base di questa colorazione, essendo le cellule del SC PAS-positive e quelle del SS PAS-negative. La reazione al PAS delle cellule del SC è dovuta al loro contenuto di glicogeno, propulsore energetico che ne supporta la migrazione embrionaria dal sacco vitellino al testicolo in formazione. Tale glicogeno, o ciò che ne resta, viene poi perduto nei successivi passaggi maturativi tanto che, all'interno del SC, non è raro vedere sparsi granuli PAS+ (Masson, 1946) estrusi da cellule neoplastiche che, pur mantenendosi piuttosto indifferenziate, riescono a compiere un iniziale passo evolutivo. Grazie alle scoperte di Masson, in medicina umana, la colorazione con PAS è stata per anni basilare nella diagnosi differenziale tra SC e SP (Müller et al., 1987; Mostofi e Sestehenn, 1998)

In anni più recenti, le moderne tecniche immunoistochimiche hanno permesso una ancor più precisa differenziazione tra le due forme. Uno dei markers più impiegati è la fosfatasi alcalina placentare (PLAP) (Hustin *et al*., 1990; Dekker *et al*., 1992, Rajpert-De Meyts *et al*., 2003). Le cellule del SC, o almeno un certo numero di esse, data la loro derivazione dal sacco vitellino e dati i loro caratteri ancestrali, ancora esprimono tale markers che verrà poi perso durante l'evoluzione da pre-spermatogonio a spermatogonio (Rajpert-De Meyts *et al*., 2003). Per quanto riguarda invece i SS, originando da stadi più evoluti delle linea seminale, sono per lo più negativi a tale marker (Cummings *et al*., 1994).

Un altro marker di frequente impiego è il CD177, recettore transmembranario per la tirosina-chinasi codificato dal proto-oncogene c-Kit (Sattler e Salgia, 2004). Nell'epitelio seminale, la positività per CD117 viene mantenuta nell'evoluzione a spermatogonio A, A1 e B mentre viene persa durante il passaggio maturativo a spermatocita (Mauduit *et al*., 1999). CD117 è quindi un buon marker per il SC e permette di identificare, all'interno di esso, anche quelle cellule che siano riuscite ad andare incontro ai primi steps maturativi.

Un altro marker di largo impiego nella diagnostica dei seminomi umani è OCT4, markers cui rispondono le cellule germinali totipotenti (Rabban e Zaloudek, 2013). La positività a tale marker è tipica del SC ed è indice di indifferenziazione; OCT4 è infatti espresso da cellule germinali totipotenti e si ritrova tanto nei SC quanto nei disgerminomi ovarici (Rabban e Zaloudek, 2013).

Modelli animali per lo studio dei seminomi umani

Trattandosi di tumori la cui diffusione è in aumento, e che possono colpire anche soggetti giovani, la ricerca sui seminomi si è molto sviluppata negli ultimi anni, in particolare nell'ambito di tre grossi filoni: la diagnostica, la cura e la patogenesi. Tali studi, e in particolare quelli riguardanti la patogenesi e la cura, potrebbero giungere a risultati importanti se si riuscisse a delineare un buon modello animale. Fino a ora si sono svolti studi su animali da esperimento in cui, tramite la somministrazione di ftalati (Mylchreest *et al*., 1999) si è riusciti a riprodurre la testicular dysgenensis syndrome, che predispone all'insorgenza di seminomi. Tuttavia, data la limitata aspettativa di vita di topi e/o ratti, in queste specie è davvero difficile intraprendere studi sui fattori che portino dagli aspetti disgenetici a quelli neoplastici. Inoltre, ratti e topi non sono specie in cui il seminoma sia segnalato, cosa invece auspicabile in un buon modello animale. Da quanto esposto si evince l'esigenza di rivolgersi ad altre specie, con più lunga aspettativa di vita e che mostrino seminomi spontanei.

Il cane è sicuramente la specie animale in cui il seminoma è più frequentemente segnalato (Dow, 1962). Il cane, inoltre, è dotato di una buonissima aspettativa di vita, in particolare ai giorni nostri. Da queste osservazioni è nata l'ipotesi che il cane potesse rappresentare un buon modello animale per lo studio dei seminomi umani e, presso l'Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano, sono state intraprese numerose ricerche che hanno ottenuto dati assai interessanti di cui si darà una breve review e che meritano di essere approfonditi attraverso studi in collaborazione con altri colleghi italiani e stranieri.

Il seminoma nel cane

Il seminoma è un tumore che si sviluppa frequentemente nel cane e la somiglianza di questo tumore con la controparte umana è stata descritta nel 1952, sulla rivista Cancer, da Scully e Coffin.

I dati epidemiologici sono assai scarsi, anche andando indietro nel tempo. In uno studio

svolto da Dow (1962) su cani sottoposti a necroscopia presso il Royal Veterinary College di Londra, sono stati osservati tumori testicolari nel 16% dei cani esaminati e il seminoma, in particolare, era presente in 45 casi. Per portare a un aggiornamento di tali vecchi dati, in anni recenti si è intrapreso uno studio analogo a quello di Dow (Grieco *et al*., 2008). Da questo studio è emerso che il 27% dei cani esaminati mostrava un tumore testicolare, un dato quindi in crescita rispetto a quanto osservato da Dow quarantacinque anni prima. Un altro risultato degno di nota è rappresentato dal fatto che, nello studio più recente, i seminomi erano 46, dato sovrapponibile ai 45 osservati da Dow, ma ciò che è interessante è che lo studio recente considerava 232 casi mentre quello di Dow ben 580.

Dai dati ottenuti certo non è stato possibile trarre conclusioni definitive, tuttavia pare emergere l'ipotesi che, anche nel cane, come nell'uomo, si sia verificato, in anni recenti, un incremento dei tumori testicolari, seminomi in particolare. Questa ipotesi merita sicuramente ulteriori studi di tipo epidemiologico e rappresenta un interessante spunto investigativo su cui lavorare, coinvolgendo più gruppi di ricerca ed eventualmente in realtà ambientali diverse: industriali e rurali.

Testicular dysgenesis syndrome nel cane

Nel corso del lavoro appena descritto si erano osservati numerosi testicoli di cane e si era notato come molti di essi mostrassero un aspetto atrofico/involuto. In alcuni di essi però sembravano osservarsi anche tubuli rivestiti da una fila di grosse cellule rotonde, dotate di ampio nucleo e abbondante citoplasma, morfologicamente sovrapponibili a gonociti.

Tali tubuli erano pertanto molto simili a quelle strutture definite "carcinomi in situ" (CIS) osservati nella TDS umana e, accanto a essi, erano talora anche presenti tubuli seminiferi già totalmente ripieni di cellule d'aspetto seminomatoso. Questo dato è sembrato assai interessante: infatti un possibile rilevamento di TDS anche nel cane avrebbe ulteriormente aumentato le evidenze di similitudini tra le problematiche testicolari del cane e quelle dell'uomo.

Si è quindi proceduto allo studio dei casi sopra menzionati con immunoistochimica per fosfatasi alcalina placentare (PLAP) che ha dato reazione positiva, dimostrando l'esistenza dei CIS e della TDS anche nel cane (Grieco *et al*., 2008) (fig.1).

Seminoma classico e seminoma spermatocitico nel cane

L'evidenza della presenza della TDS nel cane, oltre a supportare il possibile impiego di questa specie come modello per lo studio dell'analoga patologia umana, faceva supporre, anche nel cane, l'esistenza di seminomi di tipo classico, quelli cioè derivati da cellule seminali indifferenziate quali i gonociti.

La classificazione WHO dei seminomi animali non riporta alcun cenno (Kennedy *et al*., 1998), tuttavia diversi Autori a partire dal 1938 (Mc Donald *et al*., 1938, Nochomovitz e Rosai, 1978, Loojenga *et al*., 1994), hanno supposto l'esistenza nel cane di due differenti tipologie di seminoma sovrapponibili ai SC e SS dell'uomo.

Più recentemente, colleghi della Scuola napoletana (Maiolino *et al*., 2004), tramite osservazione morfometrica nucleare, hanno ulteriormente avvalorato quanto supposto già un decennio prima (De Vico *et al*., 1994) e cioè che potessero esistere, nel cane, due diversi tipi di seminoma nel cane. Infatti, nell'ambito di 23 seminomi canini esaminati, 5 mostravano dimensioni nucleari decisamente maggiori, assimilabili a quanto osservato nel seminoma classico umano, mentre nei restanti 18 le caratteristiche nucleari erano sovrapponibili a quelle riportate per il seminoma spermatocitico umano.

Sulla base di queste premesse, si è pensato di studiare i seminomi del cane con metodiche

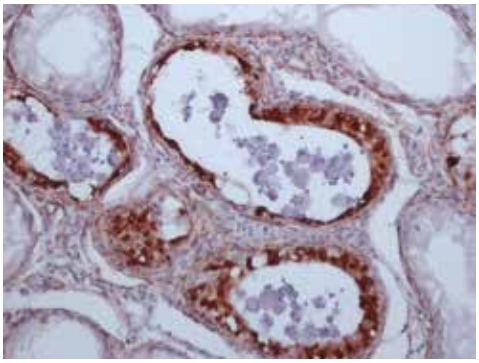


Figura 1. Sezione di testicolo di cane con Testicular Dysgenesis Syndrome. L'immunoistochimica evidenzia la presenza di tubuli d'aspetto atrofico rivestiti da grosse cellule d'aspetto gonocitario positive a fosfatasi alcalina placentare (PLAP; 100X)

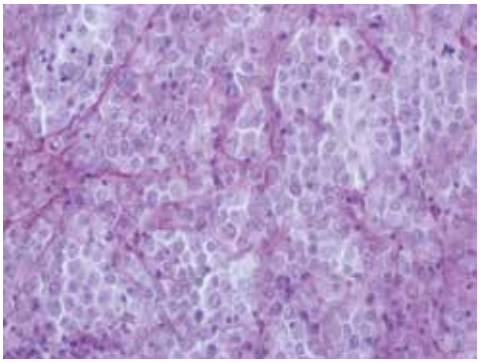


Figura 2. Sezione di testicolo di cane in cui si osserva un seminoma colorato con PAS. La negatività delle cellule neoplastiche pone il tumore tra i seminomi di tipo spermatocitico (200X)

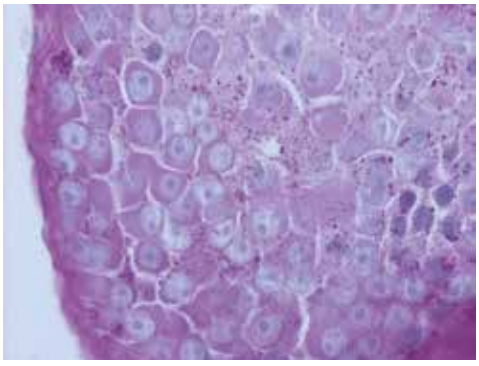


Figura 3. Sezione di testicolo di cane in cui si osserva un seminoma colorato con PAS. La positività delle cellule neoplastiche pone il tumore tra i seminomi di tipo classico (200X)

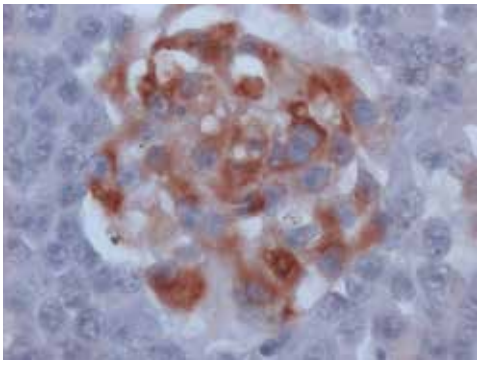


Figura 4. Sezione di testicolo di cane in cui si osserva un seminoma processato con immunoistochimica per fosfatasi alcalina placentare (PLAP). Si notano, al centro, cellule neoplastiche con citoplasma positivo. La positività per PLAP pone il tumore tra i seminomi di tipo classico (400X)

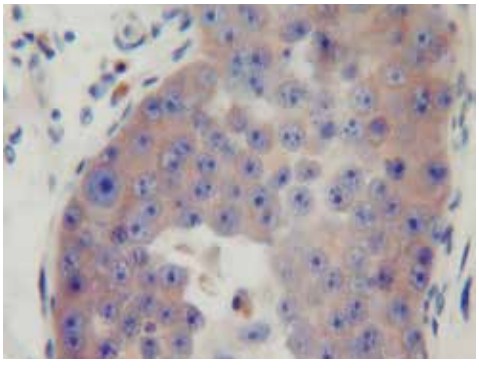


Figura 5. Sezione di testicolo di cane in cui si osserva un seminoma processato con immunoistochimica per CD117 (c-kit). Si notano, al centro, cellule neoplastiche con citoplasma positivo. La positività per CD117 pone il tumore tra i seminomi di tipo classico (400X)

istochimiche e immunoistochimiche, applicando gli stessi markers in uso in medicina umana. In un primo studio, si sono impiegate la colorazione a base di PAS e immunoistochimica per PLAP: dei 43 seminomi esaminati 23 erano negativi) a PAS e PLAP (Fig. 2) e 21 erano invece postivi (Grieco *et al*., 2007) (figg. 3 e 4). I risultati di questo lavoro hanno avvalorato l'esistenza di due forme di seminoma nel cane: la forma classica e la forma spermatocitica, ulteriormente confermate attraverso l'impiego del marker CD117 (Grieco *et al*., 2010) (fig. 5).

Altri Autori hanno poi ulteriormente confermato la presenza delle due forme seminomatose nel cane (Kim *et al*., 2010, Hohšteter *et al*., 2014) anche se la frequenza di riscontro dell'una o dell'altra forma appare ancora controversa. Infatti, nel nostro studio (Grieco *et al*., 2007), il seminoma classico sembrava essere ben rappresentato, viceversa, in un più recente studio scandinavo (Thorvaldsen *et al*., 2012), su un maggior numero di campioni, i casi di seminoma classico sembravano essere molto più rari rispetto a quelli spermatocitici cui, secondo gli Autori, dovrebbe essere ascritta la maggior parte dei seminomi canini (Bush *et al*., 2011). Questa ipotesi era già stata espressa in precedenza (Looijenga *et al*., 1994) ed è argomento interessante che merita sicuramente di essere approfondito, anche perché ci potrebbero essere variazioni tra la diffusione delle due forme a seconda dei territori.

Ad ogni buon conto, siano i seminomi spermatocitici o quelli classici a essere più diffusi nel cane, ciò che è assolutamente degno di nota è il fatto che le due forme esistano e che siano state messe a punto le metodiche per effettuare la diagnosi differenziale tra esse.

Conclusioni

Da quanto riportato, emerge che il cane potrebbe davvero rappresentare un buon modello animale per lo studio del seminoma umano. Nel cane, infatti, il seminoma si sviluppa in maniera del tutto spontanea e, al pari dell'uomo, i casi di seminoma sembrano essere più frequenti negli ultimi decenni. Il cane, inoltre, è una specie che vive a stretto contatto con l'uomo, nello stesso ambiente, condividendo nuove comodità ma, nel contempo, anche nuovi rischi per la salute. Uomo e cane quindi, possono essere esposti alle stesse problematiche patogenetiche riguardo all'insorgenza dei seminomi e anche all'insorgenza delle lesioni predisponenti quali quelle tipiche della Testicular Dysgenesis Syndrome.

Nel cane, come nell'uomo, si sviluppano tanto i seminomi classici quanto quelli spermatocitici e, anche se non è certa la loro rispettiva frequenza, ciò che è assolutamente degno di nota è il fatto che le due forme esistano e che siano state messe a punto le metodiche per effettuare la diagnosi differenziarle.

Queste metodiche, e i markers impiegati, sembrano mostrare una buonissima affidabilità e i risultati degni di attendibilità meritano di essere approfonditi, proseguendo negli studi e aprendo le porte a collaborazioni che permettano l'esame di numeri sempre più significativi di campioni.

Bibliografia

- Aflatoonian B., Moore H. (2006). Germ cell from mouse and human embryonic stem cells. Reproduction, 132: 669-707.
- Aschim E.L., Haugen T.B., Tretli S., Grotmol T. (2007). Subfertility among parents of men diagnosed with testicular cancer. International Journal of Andrology, 31: 588-594.
- Brown L.M, Pontern L.M., Hoover R.N., Devessa S.S., Aselton P., Flannery J.T. (1986). Testicular cancer in the United States: trends in incidence and mortality. International Journal of Epidemiology, 15: 164-170.
- Bush J.M., Gardiner D.W., Palmer J.S., Rajpert-De Meyts E., Veeramachaneni D.N. (2011). Testicular germ cell tumours in dogs are predominantly of spermatocytic seminoma type and are frequently associated with somatic cell tumours. International Journal of Andrology, 34: 288-295.
- Carlsen E., Giwercman A., Keiding N. & Skakkebæk N.E. (1995). Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? Environmental Health Perspectives, 103: 137-139.
- Colborn T., Vom Saal F.S., Soto, A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environmental Health Perspective, 101: 378-384.
- Cummings O.W, Ulbright T., Eble J.N., Roth L.M. (1994). Spermatocytic seminoma: an immunohistochemical study. Human Pathology, 25: 54-59.
- Damgaard I.D., Main K.M., Toppari J., Skakkebæk N.E. (2002). Impact of exposure to endocrine disrupters in utero and in childhood on adult reproduction. Best practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 16: 289-309.
- Dekker I., Rozeboom T., Delemarre J., Dam A., Oosterhuis, J.W. (1992). Placental-like alkaline phosphatase and DNA flowcytometry in spermatocytic seminoma. Cancer, 69: 993-996.
- De Vico G., Papparella S., Di Guardo, G. (1994). Number and size of silver-stained nucleoli (Ag-NOR) clusters) in canine seminomas: correlation with histological features and tumour behaviour. Journal of Comparative Pathology, 100: 267-273.
- Diekmann K.P., Pichlmeier U. (2004). Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. World Journal of Urology, 22: 2-14.
- Dow C. (1962). "Testicular tumours in the dog". Journal of Comparative Pathology, 72: 247-245.
- Fisher J.S., Macpherson S., Marchetti N., Sharpe R.M.(2003). Human testicular dysgenesis syndrome: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. Human reproduction, 18: 1383-1394.
- Fisher J.S. (2004.) Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. Reproduction, 127: 305-315.
- Franz R.(2005). Migration modelling from food-contact plastics into foodstuffs as a new tool for consumer exposure estimation. Food Additives Contaminants., 22: 920-937.
- Gaskel T.L., Esnal A., Robinson L.L.L., Anderson R.A., Saunders, P.T.K. (2004). Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulation. Biology of Reproduction, 71: 2012-2021.
- Gray L.E., Ostby J., Furr J., Price M., Veermachaneni,D.N., Parks, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP and DINP, but not DEP, DMP or DOTP alters sexual differentiation of the male rat. Toxicological Science, 58: 350-365.
- Grieco V., Banco B., Giudice C., Mosca F., Finazzi M. (2010). Immunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes. Journal of Comparative Pathology, 142: 213-217.
- Grieco V., Riccardi E., Rondena M., Ciampi V., Finazzi M. (2007). Classical and

spermatocytic seminoma in the dog: histochemical and immunohistochemical findings. Journal of Comparative Pathology, 137: 41-46.
– Grieco V., Riccardi, E., Greppi G.F., Teruzzi F., Iermanò V., Finazzi, M. (2008a). Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. Journal of Comparative Pathology, 138: 86-89.
– Grieco V., Riccardi E., Veronesi M.C., Giudice C., Finazzi M. (2008). Evidence of testicular dysgenesis syndrome in the dog. Theriogenology, 70: 53-60.
– Hayes H.M., Pendergrass T.W. (1976). Canine testicular tumors: epidemiologic features of 410 dogs. International Journal of Cancer, 18: 482-487.
– Hohšteter M., Artuković B., Severin K., Kurilj A.G., Beck A., Šoštarić-Zuckermann I.C., Grabarević Ž. (2014). Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry. BMC Veterinary Research, 6: 169.
– Honecker F., Stoop H., de Krijger R. R., Yun-Fai C.L., Bokemeyer C., Looijenga L. HJ. (2004). Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. Journal of Pathology 2004, 203: 849-857.
– Hustin J., Gillerot Y., Collette J., Franchimont P. (1990). Placental alkaline phosphatase in developing normal and abnormal gonads and in germ-cells tumours. Virchow Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology, 417: 67-72.
– Kennedy, P.C., Cullen, J.M., Edwards, J.F., Goldschmidt, M.H., Larsen, S., Munson, L. and Nielsen, S. (1998). Histological classifications of tumors of the genital system of domestic animals. In: World Health Organisation International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second series, volume IV, 17-18. Ed. By the Armed Forces Institute of Pathology , Washington D.C. (USA).
– Kim J.H., Yu C.H., Yhee J.Y., Im K.S., Kim N.H., Sur J.H. (2010). Canine classical seminoma: a specific malignant type with human classifications is highly correlated with tumor angiogenesis. BMC Cancer, 10:243.
– Looijenga L.H.J., Olie R.A., Van der Gaag I., Van Sluijs F.J., Matoska J., Ploem-Zaaijer J., Knepflé, C., Oosterhuis, J.W. (1994). Seminoma of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men?. Laboratory Investigation, 74: 490-496.
– Lottrup G., Andersson A.-M., Leffers H., Mortensen G.K., Toppai, J., Skakkebæk N.E., Main K.M. (2006). Possible impact of phthalates on infant reproductive health. International Journal of Andrology, 29: 172-180.
– Main K.M., Toppari J., Skakkebaaek N.E. (2006). Gonadal development and reproductive hormones in infant boys. European Journal of Endocrinology, 155: S51-S57.
– Maiolino P., Restucci B., Papparella S., Paciello O., De Vico G. (2004). Correlation of Nuclear Morphometric Features with Animal and Human World Health Organization International Histological Classifications of Canine Spontaneous Seminomas. Veterinary Pathology, 41: 608-611.
– Masson P. (1946). Études sur le séminome. Revue Canadiénne de Biologie, 5: 361-387.
– Mauduit C., Hamamah S., Benahmed M. (1999). Stem cell facto/c-kit system in spermatogenesis. Human Reproduction Update, 5: 535-545.
– McDonald J.R., Schlotthauer C.F., Bollman J.L. (1938). The pathogenesis of seminoma of the testis. A histologic study in dog. Surgery, 3: 904-911.
– Molyneaux K., Wylie C. (2004) Primordial germ cell migration. International Journal of Development, 48: 537-544.
– Mostofi F.K., Sesterhenn I.A. (1998). Histological typing of testis tumors. In: World Health Organisation International Histological Classification of Tumors, Second edition, World Health Organisation, Geneva.
– Mylchreets E., Sar M., Cattley R.C., Foster P.M.D. (1999). Disruption of androgen-regulated Male Reproductive Development by di(n-butyl) phthalate during late gestation

in rats is different from fluatmide. Toxicology and Applied Pharmacology, 156: 81-95.
– Müller, J., Skakkebaek, N.E. and Parkinson, M.C. (1987). The spermatocytic seminoma: views on pathogenesis. International Journal of Andrology, 10: 147-156.
– Nochomovitz L.E., Rosai, J. (1978). Current concepts on the histogenesis, pathology, and immunochemistry of germ cell tumors of the testis. Pathology. Annual, 13: 327-362.
– Rabban J.T., Zaloudek C.J. A practical approach to immunohistochemical diagnosis of ovarian germ cell tumors and sex cord-stromal tumours. Histopathology, 62: 71-88.
– Rajpert-De Meyts E., Bartkowa J., Samson M., Hoei-Hansen C.E., Frdelund-Larsen L., Bartek J., Skakkebæk (2003). The emergine phenotype of the tesicular carcinoma in situ germ cell. APMIS, 111: 267-279.
– Rajpert-De Meyts (2006). Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. Human Reproduction Update, 12: 303-323.
– Sattler M., Salgia R. (2004). Targeting c-kit mutation: basic science to novel therapies. Leukemia Research, 28S1: S11-S20.
– Scully R.F., Coffin D. (1952). Canine testicular tumor. Cancer, 5, 592-605.
– Sharpe R.M. (2001). Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. Toxicology Letters, 120: 221-232.
– Sharpe R.M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. Best practice & Research clinical endocrinology & metabolism, 20: 91-110.
– Sharpe R.M., Irvine D.S. (2006). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? British Medical Journal, 28: 447-451.
– Shettler T. (2006), Human exposure to phtalates via consumer products. International Journal of Andrology, 29: 181-185.
– Skakkebæk N.E. (1972). Possible carcinoma-in-situ of the testis. Lancet, 2: 516-517.
– Skakkebæk N.E., Rajpert-De Meyts E., Main K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Human Reproduction, 16: 972-978.
– Sonnenschein C., Soto, A.M. (1998). An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 65:143-150.
– Swan S.H., Elkin E.P., Fenster L. (2000). The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. Environmental Health Perspective, 108: 961-966.
– Tabb M.M., Blumberg B. (2006) New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. Molecular endocrinology, 20: 475-482.
– Thorvaldsen TE, Nødtvedt A, Grotmol T, Gunnes G. (2012). Morphological and immunohistochemical characterisation of seminomas in Norwegian dogs. Acta Veterinaria Scandinavica. 17:54:52.
– Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette L.J.Jr., Jégou B., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Müller J., Rajpert-De Metis E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., Skakkebæk N.E. (1996). "Male reproductive health and environmental xenoestrogens". Enviromental Health Perspectives, 104 (suppl.4): 741-803.
– Trabert B., Zugna D., Richiardi L., McGlymm K.A., Akre O. (2013). Congenital malformation and testicular germ cell tumors. International Journal of Cancer, 133: 1900-1904.

IL SUINO GIOVANE QUALE MODELLO SPONTANEO PER LO STUDIO DEL TUMORE DI WILMS NEL BAMBINO

FRANCO GUARDA[1], DOMENICO BARONE[2]

[1] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino;
[2] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Il tumore di Wilms o nefroblastoma è una neoplasia renale che colpisce l'uomo in età infantile: si manifesta, nel 50% dei casi, prima dei 3 anni di età, nel 90% prima dei 10 anni e, solo eccezionalmente, nell'età adulta (Monga e Mazzucco, 1992). Questo tumore rappresenta più dell'80% dei tumori infantili. La neoplasia si sviluppa prevalentemente in un solo rene e soltanto nel 10-15% dei casi bilateralmente. Non di rado è già presente alla nascita, colpisce maschi e femmine, e anche più soggetti in una stessa famiglia. Quest'ultima osservazione suggerisce che un'ereditarietà o comunque un'influenza genetica siano presenti in una parte dei casi di neuroblastoma. Studi effettuati su masse neoplastiche di piccole dimensioni indicherebbero l'origine del tumore da probabili residui di tessuto nefrogenico embrionale (Pennelli, 1988).

Macroscopicamente, il nefroblastoma è circondato da una pseudocapsula di parenchima renale. Alla sezione si presenta con un aspetto encefaloide, multilobato, di colore pallido, eventualmente con presenza di emorragie e focolai di necrosi. All'esame istologico si osservano tubuli epiteliali e glomeruli primitivi avascolari.

Il tessuto nefrogenico è costituito da piccole cellule immature con scarso citoplasma e con aspetti analoghi al primitivo blastema embrio-fetale. Tuttavia, sono presenti altri componenti cellulari di natura mesenchimale. In conclusione, istologicamente il tumore è costituito da 3 componenti principali e cioè: a) tubuli epiteliali, b) tessuto nefrogenico immaturo, c) stroma più o meno predominante tra di loro.

Eber (1872) stimava che il tumore originasse dal tessuto mesonefritico incorporato nel rene metanefritico, mentre Wilms (1899) includeva il mesoderma indifferenziato dal quale si sviluppava il mesonefro.

In patologia veterinaria il nefroblastoma è noto in diverse specie animali, quali il suino, il cane, il gatto, la pecora, il cavallo, il bovino, i primati e i polli. In modo particolare, nel suino il nefroblastoma è il più frequente tumore primitivo del rene (Marcato, 2015). Il primo caso è stato diagnosticato nel suino da Day nel 1907 (citato da Cotchin, 1956).

Non sono numerose le statistiche effettuale nei macelli su questo argomento. Solo Anderson *et al*. (1969) hanno osservato 13 nefroblastomi su 3,7 milioni di suini; Hayashi *et al*. (1986) su 1.630.000 capi hanno diagnosticato 74 tumori embrionali, 2 dei quali con metastasi al nefrone; Guarda *et al*. (1993) hanno descritto 15 nefroblastomi su 170.000 suini macellati. Soltanto Feldman (1932) riscontrò 46 nefroblastomi su 86 animali.

Come nell'uomo, anche nel suino la patologia insorge in giovane età; infatti, l'animale viene generalmente macellato quando non è ancora pubere**,** per le qualità organolettiche, a 3-4 mesi per ottenere alimenti tipici, oppure, più frequentemente, sugli 8-9 mesi d'età, appena dopo la pubertà. Anche i suini sono asintomatici e il nefroblastoma costituisce un reperto di macellazione.

Il tumore può insorgere in qualsiasi parte del rene, è ricoperto dalla capsula renale, può essere unico (fig.1), oppure multicentrico a piccoli noduli oppure sparsi sulla superficie esterna (fig. 2). Talvolta la massa tumorale può essere piuttosto estesa (fig. 3). Per lo più assume

Fig. 1. Suino, rene: nefroblastoma superficiale

Fig. 2. Suinio, rene: nefroblastomi multipli sparsi sulla superfice esterna

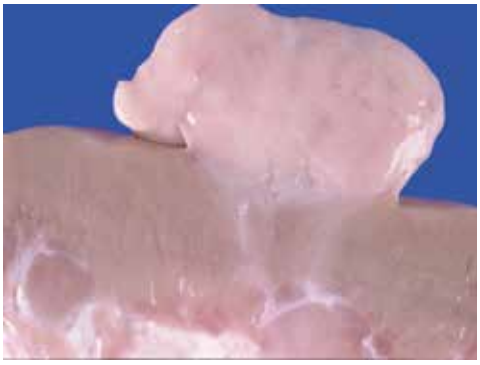


Fig. 3. Suino, rene: voluminoso nefroblastoma sulla superficie di sezione

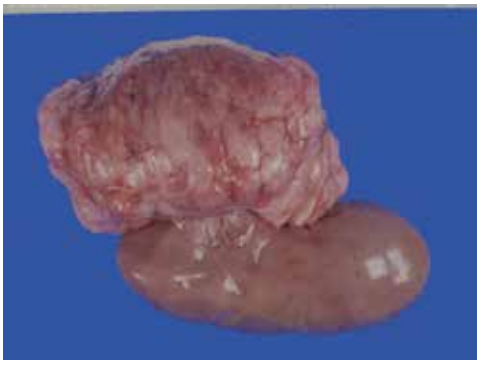


Fig. 4. Suino, rene: nefroblastoma di volume superiore al rene, localizzato a un polo

Fig. 5. Suino, rene: sezione del nefroblastoma della figura precedente

Fig. 6. Suino, rene: nefroblastoma a un polo, notevolmente più voluminoso del rene stesso

volumi a volte più estesi del rene stesso (figg. 4-6), sviluppandosi maggiormente all'esterno del parenchima renale. Altre volte si sviluppa completamente nel tessuto renale (figg. 7,8). Al contrario di quanto accade nell'uomo, sono poco frequenti le emorragie e i focolari necrotici intratumorali; la superficie esterna può essere liscia o a piccole mammellonature oppure appare diviso in lunghi solchi; alla sezione la neoplasia appare polilobata, di colorito pallido, con sottile trama connettivale.

Le metastasi sono scarse, almeno da un punto di vista macroscopico, anche se non è sempre possibile effettuare gli opportuni esami istopatologici. In un caso le metastasi raggiungevano l'uretere.

Istologicamente l'aspetto è del tutto sovrapponibile a quello della patologia umana (fig. 9). Sono presenti, a seconda del grado di immaturità, tubuli costituiti da cellule epiteliali cubiche o colonnari, talvolta con proliferazioni endoluminali immerse in un tessuto neoplastico di origine stromale (fig. 10).

Altrettanto, i glomeruli immaturi presentano un'immagine che ricorda, lontanamente, la suddivisione interna con piccole appendici o mammellonature rivestite da epitelio cubico che mimano la struttura glomerulare (fig. 11); ovviamente la struttura della neoplasia può variare a seconda del grado di immaturità e a seconda della predominanza degli elementi neoplastici.

Raramente, sono state osservate metastasi anche nell'uretere (fig. 12).

Considerazioni e conclusioni

In base alle nostre osservazioni, e a quelle degli Autori che ci hanno preceduti, nel suino l'origine e la morfologia micro- e macroscopica del nefroblastoma sono del tutto sovrapponibili a quelle della patologia umana, il che indica un'origine identica della neoplasia nelle due specie, anche se, da caso a caso, può presentare alcune differenze a seconda del grado di maturità.

Tuttavia, nel suino, a causa di assenza di sintomi, la presenza della lesione può essere soltanto osservata a 8-10 mesi, come reperto di macellazione. Un'altra considerazione che possiamo esprimere riguarda il grado di malignità, considerata piuttosto scarsa nel suino al contrario di quanto avviene per il bambino, che è molto alta. A questo proposito possiamo palesare alcuni dubbi, in quanto le osservazioni macroscopiche non sono sufficienti a esprimere il grado di malignità di una neoplasia e non sempre al macello è possibile, per motivi economico-industriali, effettuare osservazioni più approfondite. In ogni caso, anche nel suino i nefroblastomi sono unilaterali. L'ontogenesi della neoplasia è considerata una malfunzione del tessuto embrionale, per lo più nel blastema metanefrogenico (Lucké e Schlumberger, 1957). Una differenza tra l'uomo e il suino è che non è noto se la patologia colpisce maggiormente i maschi o le femmine, in quanto gli animali macellati sono stati per lo più castrati.

Dal punto di vista comparativo, poi, è molto interessante notare che Olcott, (1950), Bulbok e Curtis (1930), e Babcock e Sontam (1961) descrissero un nefroblastoma trapiantabile nel ratto bianco. Anche nella trota Schlumberger (1997) diagnosticò un nefroblastoma del tutto simile al nefroblastoma umano. Inoltre nei polli si conoscono nefroblastomi trapiantabili (Duran Reynal, 1946; Ishiguro *et al*., 1962). Guillon e Chauronlinkov (1963) riprodussero il tumore con l'oncovirus del complesso della leucosi aviare, confermato da Franciosini *et al*. (1992) con evidenza dell'oncovirus di tipo C.

In conclusione, si può affermare che il nefroblastoma rappresenta una lesione molto complessa, nella quale rientrano problemi non ancora del tutto risolti, quali l'ontogenesi e l'eziologia. Gli studi condotti sugli animali, e in particolare sul suino, possono portare contributi fondamentali alla risoluzione degli aspetti non ancora chiariti, offrendo chiare analogie con la corrispondente patologia umana.

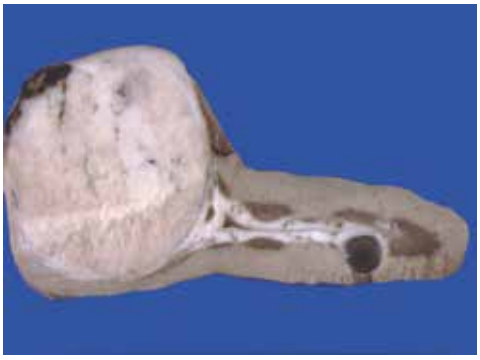


Fig. 7. Suino, rene: nefroblastoma in sezione, che occupa l'intero lobo dell'organo

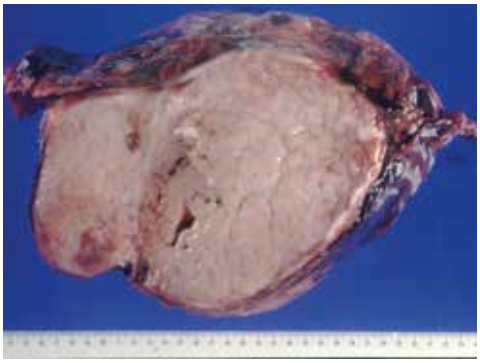


Fig. 8. Suino, rene: nefroblastoma in sezione, che occupa l'intero lobo dell'organo

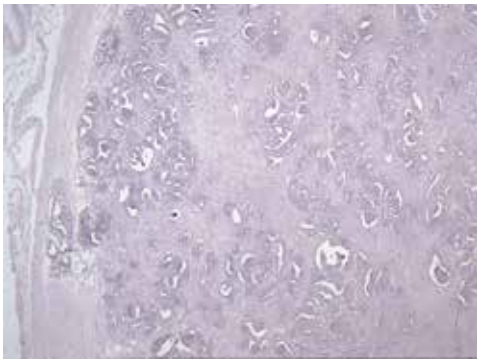


Fig. 9. Suino, rene: quadro istopatologico del nefroblastoma del suino (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingrandimento)

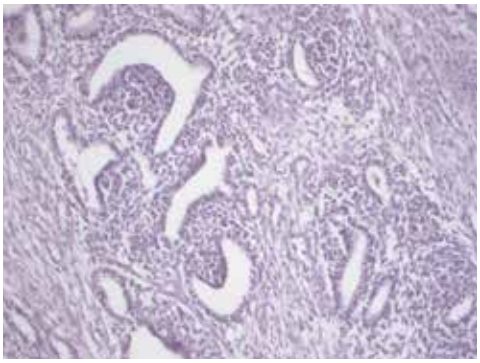


Fig. 10. Suino, rene: nefroblastoma: tubuli neoplastici metanefrici circondati da cellule stromatiche (colorazione Ematossilina-Eosina; medio ingrandimento)

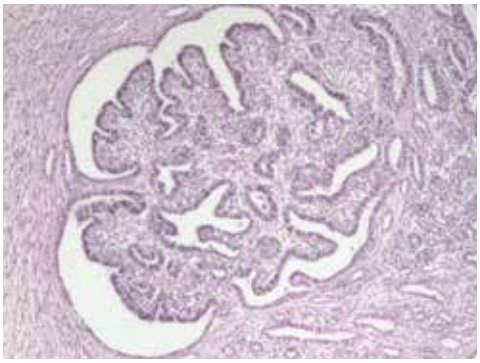


Fig. 11. Suino, rene: nefroblastoma: glomerulo immaturo neoplastico che imita grossolanamente la struttura normale (colorazione Ematossilina-Eosina; medio ingrandimento)

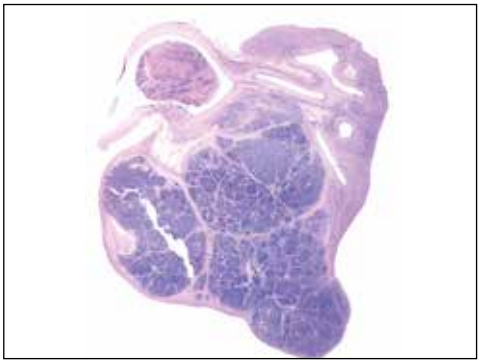


Fig. 12. Suino, rene: nefroblastoma: quadro istopatologico; interessamento dell'intero parenchima renale, con grossa metastasi nell'uretere (colorazione Ematossilina-Eosina; piccolo ingrandimento)

Bibliografia

- Anderson L. J., Sandison, A. T., Jarret, W. F. H. (1969) A British abbattoir survey of tumor in cattle, sheep and pigs. Vet. Rec. 84, 547
- Babcock, V. J. and Sontam C. M. (1961) Transplantable renal tumor of rat. Cancer Res., 21, 30
- Bulbok, F. F. and Curtis, M. R. (1930) citato da Willis
- Cotchin, E. (1956) Neoplasms of domesticated mammals. Comm. Agric. Bureau 1956, London
- Day, L. E. (1907) Embryonal adenomiosarcoma of the kidney of swine. 24th annuary report. Bureau of animal industry, Washington D. C.
- Duran-Reynals, F. (1946) On transplantability of lymphoid tumor, embryonal nephroma and carcinoma of chickens. Cancer Res. 6, 545
- Eber, C. J., (1872) Myoma sarcomatodes renum. Wirchow Arch. Path. Anat. 55, 518
- Feldman, W. (1932) – Neoplasms of domesticated animals, Saunders, Philadelfia
- Franciosini, M. P., Asdrubali, G., Mugetti, L., e M. Colletti (1992). Su alcuni casi di nefroblastoma dei polli da carne leggeri. Atti del XXX Convegno della Società di Patologia Aviare, pag. 68.
- Guarda, F., Griglio, B., Appino, S., e Brusa, F. (1993) Sul nefroblastoma del suino. Doc. Vet. 1, 23
- Guillon, J. C., e Chauronlinkov, I. (1963) Les toumeurs renales spontanees des gallinacea. Bull. Canc. 50, 593
- Hayashi, M., Tsuda, H., Okumura, M., Hirose, M., e Ito, N. (1986)Histopathological classification of nephroblastoma in slaughtered swine. J. Comp. Path. 96, 35
- Ishiguro, H., Blard. D., Sommre, J. R., Heine., U., et al. (1962). Multiplicity of cell response to the BAI strain A (Myeloblastosis) avian tumor virus. J. Nat. Cancer Inst. 29, 1
- Luckè, B., e Schumberger, H. G. (1957) Tumors of the kidney. Am. Forces Inst. Path., Washington D. C.
- Marcato, P. S. Patologia Sistematica Veterinaria e Agricola, Bologna 2015
- Monga, G., e Mazzucco, G. (1992) Apparato Urinario in: Ascenzi, A. e Mottura, G. Trattato di Anatomia Patologica, UTET, Torino
- Olcott, C. T. (1950) A transplantable nephroblastoma and other spontaneous tumors in a colony of rats. Cancer Res. 10, 625
- Pennelli, N. (1988) Tumori del rene, in: Calè A e Fiore-Donati: Anatomia Patologica, USES, Firenze
- Schlumberger, G. (1957) citato da Lucke B. e Schlumberger
- Wilms, M. (1899) Die Mischgeschwülste, Georgi, Leizig
- Willis, R.A., (1960) Pathology of tumors, Butterworths, London

IL CANE COME MODELLO ANIMALE PER LO STUDIO DELLE NEOPLASIE EMATOPOIETICHE DELL'UOMO

STEFANO COMAZZI[1], LUCA ARESU[2]

[1] Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano;
[2] Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova

A oggi, lo studio delle neoplasie ematopoietiche dell'uomo, sia solide (linfoma) sia non (leucemie acute e croniche), ha beneficiato in prevalenza di modelli animali di laboratorio quali topi immunocompromessi attraverso cui è possibile trapiantare "tumor xenografts" o topi transgenici "knockout" per determinati geni, con lo scopo di studiare i meccanismi oncogenetici e testare nuovi farmaci. Questi modelli risultano utili in quanto fortemente predittivi del comportamento delle varie neoplasie, ma risentono di alcuni bias biologici che possono in buona parte essere risolti dall'utilizzo di un modello spontaneo. Il limite del modello murino è l'assenza della complessità di interazioni tra la crescita neoplastica e il sistema immunitario, considerato sempre più fondamentale per l'insorgenza di tumori e per il successo delle terapie associate. Il cane, al contrario, offre un modello animale con patologie spontanee che riproduce appieno tutte le caratteristiche di un organismo immunocompetente e che ben si presta allo studio di protocolli terapeutici, quali l'immunoterapia. Analogamente l'approccio diagnostico, terapeutico e di monitoraggio utilizzato nel paziente canino riproduce in modo fedele quello usato in medicina umana e si rivela un utile complemento per quei sottotipi tumorali per cui è descritta un'elevata analogia.

Diversi lavori in letteratura veterinaria dimostrano come il linfoma nel cane presenti numerose similarità con la controparte umana in termini d'incidenza (circa 84 casi su 100.000 cani all'anno), di presentazione clinica, di classificazione e di approccio diagnostico-terapeutico.

Gli schemi classificativi proposti per il linfoma del cane ricalcano quelli utilizzati in medicina umana e alcuni autori (Valli, 2011) hanno introdotto un sistema di classificazione che mira a riprodurre lo schema REAL-WHO dell'uomo. Nel cane, la maggior parte dei linfomi mostra presentazione multicentrica, crescita diffusa, con una netta prevalenza del sottotipo Diffuso a Grandi Cellule B (DLBCL) (fig. 1). Altri sottotipi con minor frequenza sono rappresentati da: Linfoma a Cellule Periferiche T (PTCL) (fig. 2), Linfoma Marginale (MZL) e Linfoma Linfoblastico (LL). Al contrario, il Linfoma Follicolare (FL) (fig. 3), che presenta una notevole incidenza nell'uomo, risulta poco frequente nel cane. Interessante nel cane è un peculiare sottotipo di linfoma T indolente che origina dalla zona T paracorticalica dal nome di Linfoma T-zone (TZL) (fig. 4).

Recentemente, in medicina veterinaria, attraverso studi di Gene Expression Profile (GEP), sono stati identificati nel cane due sottotipi molecolari del DLBCL (Richards *et al*., 2013). Il primo è caratterizzato da cellule originanti dal centro germinativo (GC), con un comportamento clinico meno aggressivo. Il secondo profilo, invece, sembra originare dalle cellule B attivate. Tale sottotipo è anche il più diffuso nel cane, confermando il suo ruolo come possibile modello per questo sottotipo.

L'approccio diagnostico, terapeutico e di monitoraggio del linfoma canino generalmente ricalca quelli in uso in medicina umana. Nell'iter diagnostico, la citologia riveste notevole importanza per un primo screening valutativo. Questo elemento non trova analogia in medicina umana, ma è giustificato in veterinaria dal basso costo dell'esame e soprattutto dal fatto che il linfoma a pattern diffuso rappresenta la crescita neoplastica più frequente nel cane, di conseguenza il campionamento citologico per ago-aspirazione permette in gran parte dei

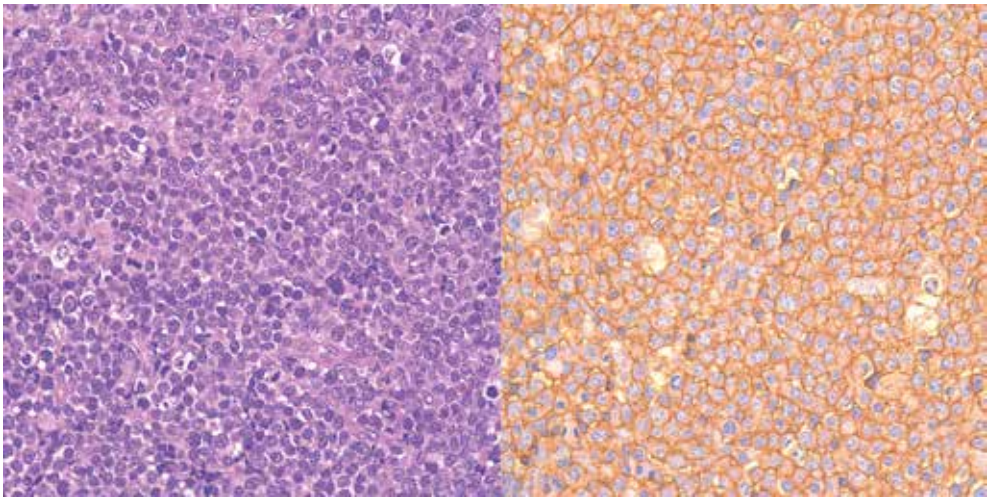


Fig. 1. Cane. Linfoma diffuso B a grandi cellule (DLBCL). L'esame istologico mostra la proliferazione diffusa di una popolazione cellulare prevalentemente costituita da centroblasti e immunoblasti. Le cellule neoplastiche risultano positive per l'anticorpo anti-CD20 attraverso esame immunoistochimico.

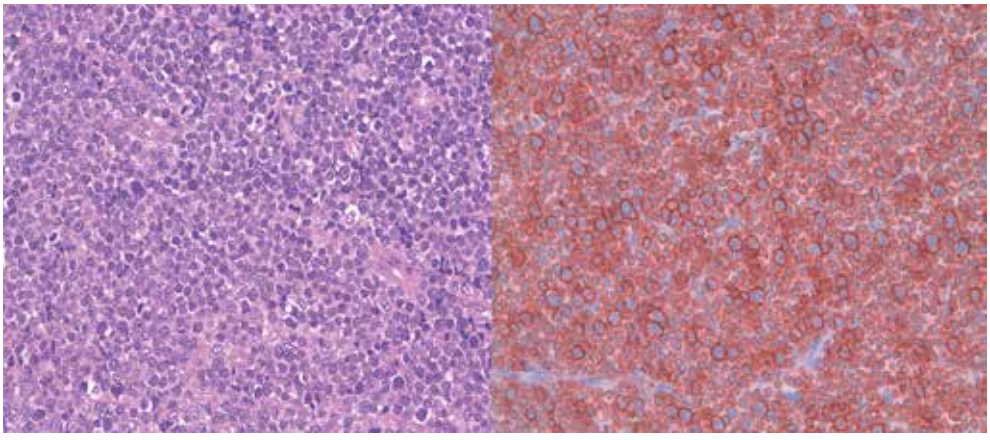


Fig. 2. Cane. Linfoma periferico a cellule T a grandi cellule (PTCL). L'esame istologico mostra la proliferazione diffusa di una popolazione cellulare caratterizzata da un elevato pleomorfismo e indice mitotico. Le cellule neoplastiche risultano positive per l'anticorpo anti-CD3 attraverso esame immunoistochimico.

casi di fornire una popolazione adeguata per la diagnosi. La valutazione citoarchitetturale mediante istopatologia, indispensabile per la diagnosi di linfomi di basso grado/nodulari, è determinante per un numero limitato di sottotipi, ma rimane comunque sempre consigliata per una corretta classificazione del sottotipo. Esami ancillari quali l'immunofenotipo citofluorimetrico, l'immunoistochimica e la valutazione della clonalità mediante PCR (PARR) assu-

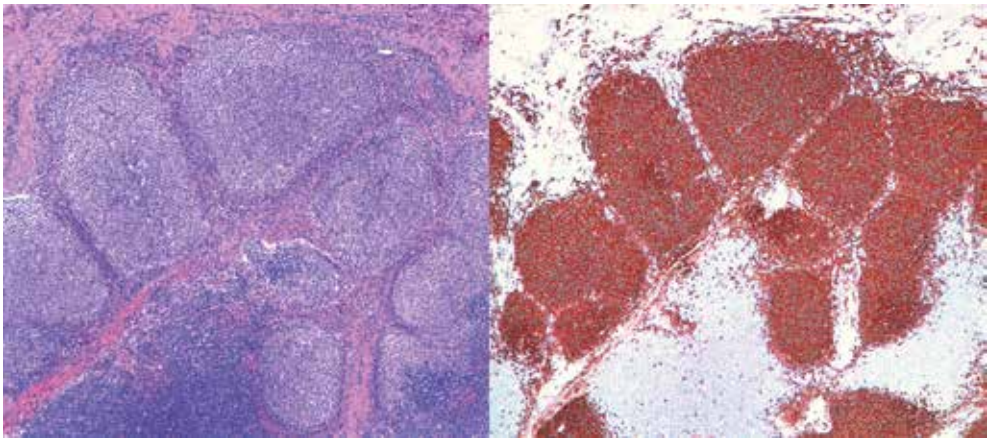


Fig. 3. Cane. Linfoma Follicolare (FL). L'esame istologico mostra la proliferazione focale di una popolazione cellulare che origina dai centri germinativi costituita da circa il 70% di centroblasti e 30% di centrociti. La popolazione cellulare neoplastica risulta positiva per l'anticorpo anti-CD20.

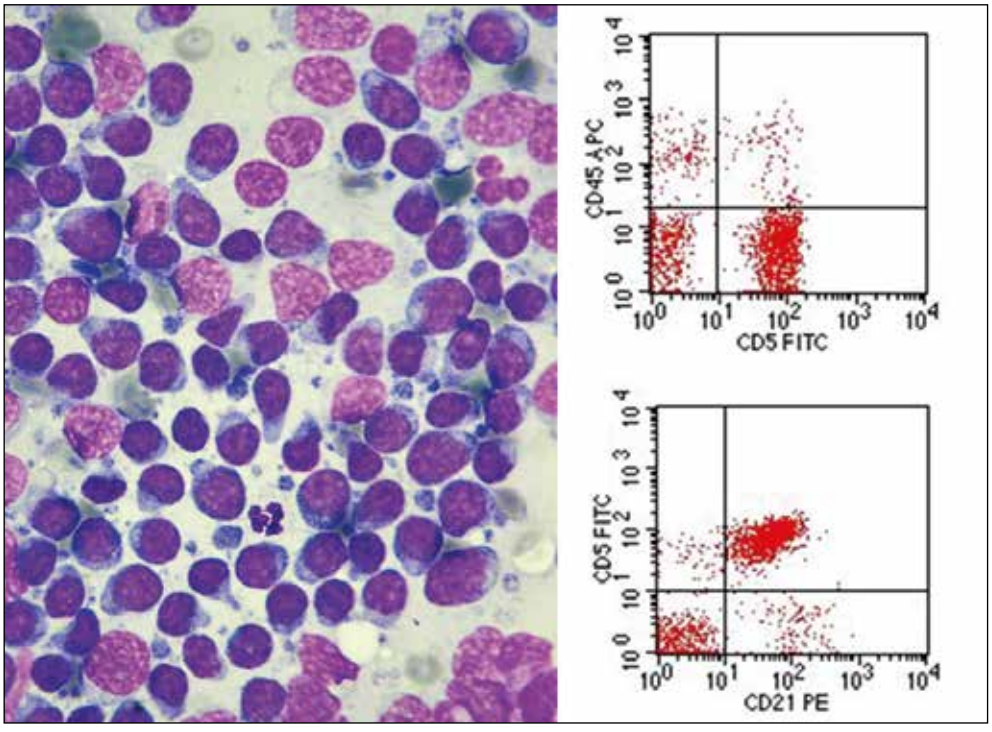


Fig. 4. Cane. T zone Lymphoma (TZL). L'esame citologico mostra una popolazione prevalente di cellule di piccole dimensioni a citoplasma chiaro e frequente aspetto a racchetta o "hand mirror". Il quadro citofluorimetrico mostra il caratteristico pattern aberrante CD5+CD21+CD45-.

mono sempre più importanza all'interno del processo diagnostico (Comazzi e Gelain, 2011, Marconato *et al*. 2013), per la corretta classificazione del sottotipo, e la stadiazione e il monitoraggio della malattia residua (Aresu *et al*., 2014).

Negli ultimi anni, l'approccio terapeutico del linfoma nel cane tende, analogamente a quanto proposto nell'uomo, a diversificarsi in conseguenza di un approccio personalizzato in base alle caratteristiche di ogni singolo paziente e tipologia di linfoma. L'approccio polichemioterapico, che rimane il trattamento preferenziale, viene sempre più frequentemente associato a protocolli radioterapici, chirurgia (soprattutto per le forme spleniche localizzate), immunoterapia e in alcuni casi a trapianto di midollo. La sopravvivenza è estremamente variabile e risulta in funzione di numerose caratteristiche. Seppur rara, la sopravvivenza sopra i tre anni post-trattamento è suggestiva di guarigione, ed è stata associata ad alcune caratteristiche clinico-patologiche che riguardano il tipo di linfoma e il paziente stesso (Marconato *et al*., 2011).

Una prospettiva terapeutica, per la quale il modello canino riveste notevole interesse, è l'immunoterapia. Il paziente canino, essendo immunocompetente, si presta in modo efficace per valutare gli effetti di terapie immunitarie attive (vaccini) o passive (anticorpi monoclonali) come adiuvante alla classica chemioterapia dose-intensa. Recentemente, alcuni studi effettuati sui linfomi a immunofenotipo B (Marconato *et al*., 2014; Marconato *et al*., 2015) hanno dimostrato come il cane non solo possa beneficiare di tale approccio, ma possa fungere anche come modello per trial clinici. Proprio i trial clinici nel cane contribuiranno in futuro a velocizzare notevolmente l'iter di validazione di nuove terapie, permettendo di arruolare pazienti "naive" in luogo di pazienti "non-responding" alle convenzionali terapie. Inoltre, la possibilità di avere una maggiore flessibilità nel disegno sperimentale e le minori implicazioni di carattere etico e legale possono consentire di completare studi in tempistiche ridotte (2-3 anni) a fronte dei 10-15 anni necessari generalmente per le sperimentazioni nell'uomo (Hansen e Khanna, 2004). Infine, la più breve vita del paziente canino e la ridotta durata della remissione dopo terapia consentono di raggiungere più facilmente end-points prestabiliti contribuendo ad abbreviare i tempi per la sperimentazione clinica.

Accanto al possibile ruolo come modello terapeutico, vi sono altri aspetti del linfoma del cane che dimostrano la sua efficacia come modello per la medicina umana. Innanzitutto, da un punto di vista epidemiologico il cane condivide con il proprietario gli stessi fattori di rischio ambientali, pur non associati agli aspetti legati all'abuso (fumo) e alla predisposizione genetica. Se si aggiunge che la più breve durata della vita tende a essere correlata a un più rapido sviluppo delle neoplasie, si intuisce come una adeguata raccolta dei dati epidemiologici del linfoma nel cane possa permettere di trarre indicazioni utili anche per il monitoraggio ambientale nell'uomo. Studi effettuati durante la cosiddetta "crisi della spazzatura" nel napoletano hanno di fatto evidenziato un incremento significativo di differenti neoplasie nel cane (linfoma "in primis") (Marconato *et al*., 2009) simili a quanto riscontrato nell'uomo nella stessa area (Senior e Mazza, 2004)

Un altro aspetto nel quale il cane può fungere da buon modello per il linfoma umano riguarda i meccanismi patogenetici. Se da un lato la medicina umana può beneficare dei risultati degli studi eseguiti sul cane per le entità che hanno maggior analogia (come per esempio il DLBCL ABC) ancor più interessanti possono essere le ricerche sui sottotipi del cane che non hanno controparte nell'uomo o con presentazione rara. In questo caso lo studio della patogenesi del linfoma canino può aprire nuovi scenari per meglio comprendere i meccanismi alla base della trasformazione neoplastica. E' verosimilmente questo il caso di neoplasie frequenti nel cane, ma rare nell'uomo come il TZL o i PTCL.

Inoltre il cane offre un ottimo modello per lo studio degli aspetti genetici connessi alla predisposizione all'insorgenza del linfoma. La selezione stretta operata per la creazione di più di 400 diverse razze canine ha portato alla formazione di veri e propri "clusters" genetici senza uguali nella specie umana. Le diverse razze mostrano predisposizioni per differenti tipi di lin-

fomi (Modiano *et al*., 2005). Il boxer in particolare sembrerebbe maggiormente predisposto ad alcuni tipi di linfoma T, come il LL (Lurie *et al*., 2008). Queste predisposizioni possono variare in funzione delle diverse linee genetiche. Studi effettuati su casistica americana hanno mostrato una netta prevalenza di linfomi e ancor più specificatamente nel linfoma T-zone del Golden Retriever, seppur con prevalenze variabili tra le diverse aree (Ruple *et al*., 2016). Tale predisposizione non è descritta nella popolazione di Golden Retriever in Europa. Lo studio delle differenze genetiche tra le due diverse linee potrebbe aprire nuovi scenari sulla comprensione delle alterazioni alla base della predisposizione alla trasformazione linfomatosa.

Contrariamente ai linfomi, le leucemie canine mostrano invece una ridotta analogia con le relative forme umane. Il cane tende a sviluppare sia forme di leucemia acuta sia cronica, in prevalenza linfoidi, ma con peculiarità che tendono a non supportare molto il loro possibile uso come modello animale. Le leucemie linfocitiche croniche (LLC) canine non sono rare, ma mostrano in prevalenza un caratteristico immunofenotipo T citotossico (Comazzi *et al*., 2011) diverso da quello delle forme umane. Tuttavia anche nel cane, seppur più rari, esistono LLC a cellule B che studi recenti (Bromberek *et al*., 2016) hanno mostrato avere caratteristiche maggiormente sovrapponibili a quelle dell'uomo. Per quello che riguarda le forme acute, il cane sviluppa sia leucemie linfoidi sia mieloidi. In entrambi i casi queste forme manifestano un comportamento molto aggressivo, analogamente a quanto visto nell'uomo seppur con una scarsa risposta ai farmaci antiblastici, che molto raramente riescono a indurre citolisi (Novacco *et al*., 2015; Bennet *et al*., 2016). Questa maggior resistenza delle cellule neoplastiche canine rispetto alle analoghe umane è a oggi inspiegabile ma è spesso responsabile della scarsa prognosi e della limitata sopravvivenza che rende difficoltoso qualsiasi studio di tipo comparativo. Uno studio eseguito recentemente sulle leucemie mieloidi canine ha dimostrato la variabilità di questa neoplasia in termini di metilazione globale e l'associazione in alcuni casi delle mutazioni puntiformi all'interno del gene DNMT3 (Bronzini *et al*., 2016). Il ruolo dell'epigenetica, e più specificatamente della metilazione, ha assunto negli ultimi anni estrema importanza in oncologia umana. Rimangono tuttavia necessari ulteriori studi per confermare il possibile ruolo del cane come buon modello per questo tipo di analisi, date le numerose difficoltà nel creare alterazione di metilazione negli animali di laboratorio

Bibliografia

- Aresu L, Aricò A, Ferraresso S, Martini V, Comazzi S, Riondato F, Giantin M, Dacasto M, Guadagnin E, Frayssinet P, Rouquet N, Drigo M, Marconato L. Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma.Vet J. 2014;200(2):318-324.
- Bennett AL, Williams LE, Ferguson MW, Hauck ML, Suter SE, Lanier CB, Hess PR. Canine acute leukaemia: 50 cases (1989-2014). Vet Comp Oncol. 2016. doi: 10.1111/vco.12251
- Bromberek JL, Rout ED, Agnew MR, Yoshimoto J, Morley PS, Avery AC Breed Distribution and Clinical Characteristics of B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia in Dogs. J Vet Intern Med. 2016;30(1):215-222
- Bronzini I, Aresu L, Paganin M, Marchioretto L, Comazzi S, Cian F, Riondato F, Marconato L, Martini V, Te Kronnie G. DNA methylation and targeted sequencing of methyltransferases family genes in canine acute myeloid leukaemia, modelling human myeloid leukaemia. Vet Comp Oncol. 2016. doi: 10.1111/vco.12231.
- Comazzi S, Gelain ME, Martini V, Riondato F, Miniscalco B, Marconato L, Stefanello D, Mortarino M. Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. J Vet Intern Med. 2011;25(1):100-106.
- Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma.Vet J. 2011 May;188(2):149-155.
- Hansen K, Khanna C. Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. Eur J Cancer 2004; 40: 858–880
- Lurie DM, Milner RJ, Suter SE, Vernau W. Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. Vet Immunol Immunopathol. 2008;125(1-2):102-110
- Marconato L, Frayssinet P, Rouquet N, Comazzi S, Leone VF, Laganga P, Rossi F, Vignoli M, Pezzoli L, Aresu L. Randomized, placebo-controlled, double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma. Clin Cancer Res. 2014;20(3):668-677
- Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. Hematol Oncol. 2013;31(1):1-9
- Marconato L, Leo C, Girelli R, Salvi S, Abramo F, Bettini G, Comazzi S, Nardi P, Albanese F, Zini E. Association between waste management and cancer in companion animals. J Vet Intern Med. 2009;23(3):564-569
- Marconato L, Stefanello D, Sabattini S, Comazzi S, Riondato F, Laganga P, Frayssinet P, Pizzoni S, Rouquet N, Aresu L. Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma.Vaccine. 2015;33(39):5080-5086
- Marconato L, Stefanello D, Valenti P, Bonfanti U, Comazzi S, Roccabianca P, Caniatti M, Romanelli G, Massari F, Zini E. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. J Am Vet Med Assoc. 2011;238(4):480-485
- Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, Avery PR, Lindblad-Toh K, Ostrander EA, Cutter GC, Avery AC. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. Cancer Res. 2005;65(13):5654-5661
- Novacco M, Comazzi S, Marconato L, Cozzi M, Stefanello D, Aresu L, Martini V. Prognostic factors in canine acute leukaemias: a retrospective study. Vet Comp Oncol. 2015. doi: 10.1111/vco.12136
- Richards KL, Motsinger-Reif AA, Chen HW, Fedoriw Y, Fan C, Nielsen DM, Small GW,

Thomas R, Smith C, Dave SS, Perou CM, Breen M, Borst LB, Suter SE.Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL Cancer Res. 2013;73(16):5029-5039
– Ruple A, Avery AC, Morley PS.Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. Vet Comp Oncol. 2016. doi: 10.1111/vco.12258.
– Senior K, Mazza A.Italian "Triangle of death" linked to waste crisis.Lancet Oncol. 2004 Sep;5(9):525-527.
– Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, Kiupel M, Labelle P, Lester S, Miller M, Moore P, Moroff S, Roccabianca P, Ramos-Vara J, Ross A, Scase T, Tvedten H, Vernau W.Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. Vet Pathol. 2011;48(1):198-211.

VACCINOTERAPIA A DNA NEL MELANOMA MALIGNO CANINO COME STUDIO PRE-CLINICO DEL MELANOMA UMANO

VALERIA ROLIH[1], FEDERICA CAVALLO[1], PAOLO BURACCO[2], FEDERICA RICCARDO[1]

[1] Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Centro di Biotecnologie Molecolari, Università degli Studi di Torino; [2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

I modelli pre-clinici e il concetto di oncologia comparata

Il cancro è una patologia estremamente complessa, e durante la sua progressione si stabiliscono numerose e intricate interazioni tra le cellule neoplastiche e quelle del microambiente che plasmano le caratteristiche del tessuto tumorale nel suo complesso, determinando l'evoluzione della malattia (1). Un ruolo preponderante in queste interazioni è svolto dalle cellule del sistema immunitario (2,3). La composizione dell'infiltrato immunitario può variare a seconda dello stadio della progressione tumorale e può in effetti avere una forte influenza sulla sopravvivenza del paziente (3). Di conseguenza, il concetto di immunoterapia dei tumori, finalizzata ad armare in maniera appropriata il sistema immunitario dell'organismo affetto da tumore per attaccare specificatamente il tumore stesso, sta vivendo un vero e proprio "Rinascimento" (4). La complessità del rapporto tra il tumore e il sistema immunitario richiede che la valutazione pre-clinica del reale potere delle strategie immunoterapeutiche venga effettuata in modelli sperimentali in vivo. Pertanto l'efficacia traslazionale nella pratica clinica dei nuovi approcci immunoterapeutici dipende dalla disponibilità di modelli pre-clinici fedeli e molto predittivi.

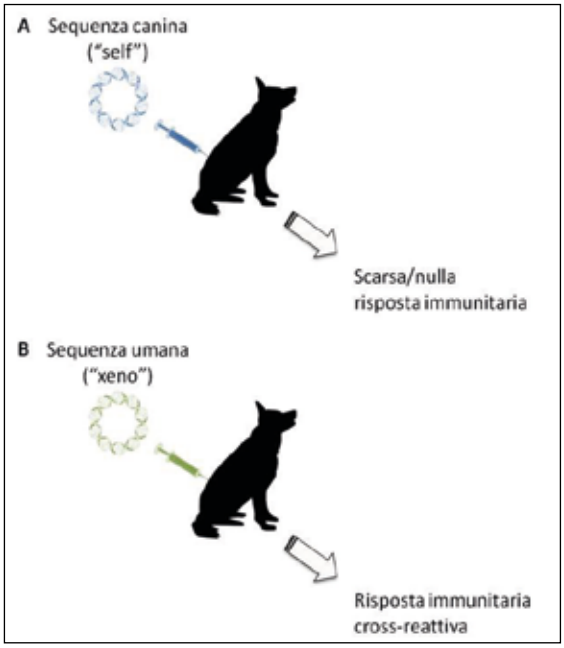


Fig. 1. Rappresentazione schematica delle strategie di vaccinazione a DNA in pazienti canini. (A) Vaccinazione a DNA con un plasmide codificante la sequenza canina, perciò "self", del TAA di interesse. La sequenza canina del TAA è tollerata dall'organismo, pertanto non è in grado di indurre una risposta immunitaria anti-tumorale efficace. (B) Vaccinazione a DNA con un plasmide codificante la sequenza umana, perciò "xenogenica", del TAA di interesse. La sequenza umana del TAA è efficace nel rompere la tolleranza immunologica e nell'indurre una forte risposta immunitaria anti-tumorale diretta contro il TAA xenogenico codificato dal plasmide, ma cross-reattiva anche contro il TAA "self" presente sulle cellule tumorali del pazienti canino.

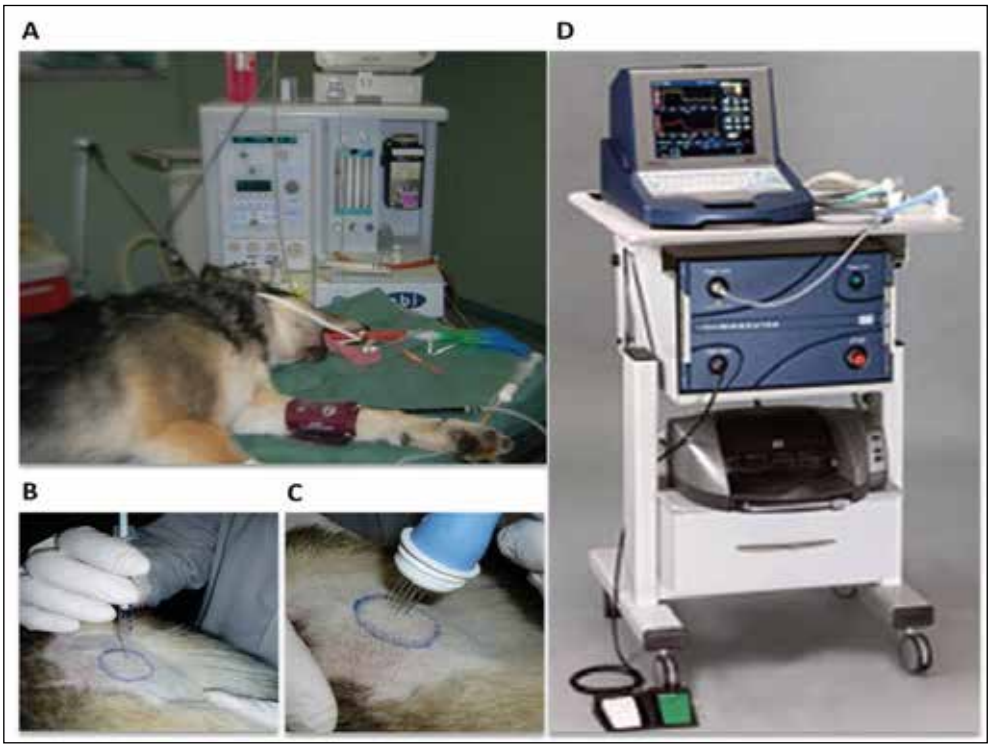


Fig. 2. Immagini dettagliate della procedura di elettrovaccinazione in un paziente canino affetto da MM. (A) Induzione dell'anestesia. (B) Iniezione intramuscolo di 500 μg di plasmide a DNA codificante per la molecola CSPG4 umana. (C) Applicazione degli impulsi elettrici mediante l'utilizzo di aghi (elettrodi): 1 ad alto voltaggio (HV, 450 V, durata 50 ms, frequenza 3 Hz) e 8 a basso voltaggio (LV, 110 V, durata 20 ms, pausa 300 ms). (D) Elettroporatore, CLINIPORATOR™ (Igea, Carpi, Italia).

Considerata la complessità dei tumori umani e la multidimensionalità delle interazioni tra il sistema immunitario e le cellule neoplastiche, gli immunologi hanno da sempre ricercato modelli che potessero rappresentare, nel modo più fedele possibile, questo complesso *milieu*. A tal fine sono stati sviluppati negli ultimi decenni numerosi modelli murini sperimentali sempre più complessi e completi, dai modelli di tumori trapiantabili, a quelli transgenici o geneticamente modificati, fino alla generazione di modelli murini umanizzati. Questi modelli hanno contribuito senza dubbio alla comprensione dei meccanismi molecolari della carcinogenesi e del ruolo del sistema immunitario nella progressione delle neoplasie (5), tuttavia il loro valore predittivo dell'efficacia delle strategie immunoterapeutiche nei trial clinici umani rimane controverso. Infatti, se da un lato, nonostante gli incoraggianti risultati pre-clinici ottenuti in questi modelli, i trial clinici in oncologia presentano ancora un elevatissimo tasso di fallimenti (6), d'altro canto, proprio grazie agli studi pre-clinici condotti in modelli murini è stato possibile dimostrare l'efficacia anti-tumorale degli anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1, utilizzati poi con successo nella clinica umana (7,8).

Tuttavia, i modelli murini non riproducono i tumori umani nella loro complessità, ma piuttosto tentano di riprodurre - talvolta in modo alquanto artificioso e quindi con valore predittivo discutibile - specifici aspetti della patologia per rispondere a domande precise. Inoltre, non tutti gli aspetti importanti per la definizione di un protocollo immunoterapeutico possono essere opportunamente valutati nei modelli murini. Ad esempio, lo studio della sicurezza, dell'immunogenicità e del dosaggio di nuove immunoterapie, se realizzato nei modelli murini, spesso non è predittivo della risposta nell'uomo (9). Per essere maggiormente predittivo questo tipo di studio è talvolta condotto in animali di grossa taglia, come i primati non umani (NHPs), che presentano un sistema immunitario molto simile a quello dell'uomo (10). Tuttavia, gli studi immunologici nei NHPs sono molto costosi. Inoltre, poiché l'insorgenza spontanea di neoplasie è un evento estremamente raro nei NHPs, gli studi condotti in questo modello non sono predittivi della reale efficacia terapeutica in condizioni di immunosoppressione indotta dal tumore. È quindi necessaria l'identificazione di modelli maggiormente informativi, che riproducano simultaneamente gran parte delle caratteristiche dei tumori umani e che siano più predittivi dell'efficacia clinica di specifici approcci immunoterapeutici. Da qui è nato, e sta acquisendo sempre maggior riconoscimento, il concetto dell'oncologia comparata, che mira a integrare lo studio dei tumori che insorgono spontaneamente negli animali domestici, in particolare nel cane, con lo studio della biologia dei tumori umani e delle relative terapie (11,12).

I tumori spontanei del cane: modelli pre-clinici di alto valore traslazionale

Le forti similarità anatomiche e fisiologiche esistenti con l'uomo e il numero elevato di diagnosi di tumore hanno portato i cani da compagnia al centro della ricerca biomedica e oncologica. Ormai da qualche anno sia il *National Cancer Institute's Center for Cancer Research* in America (13) che il progetto LUPA in Europa (14) hanno lanciato il programma di oncologia comparata proprio per favorire lo studio dei tumori canini come modelli per i tumori umani, con il fine ultimo di identificare nuove terapie efficaci sia in ambito veterinario sia in ambito clinico umano.

I vantaggi offerti dallo studio dei tumori che insorgono spontaneamente nei pazienti canini sono molteplici. Innanzitutto i cani vivono in stretto rapporto con l'uomo e sono colpiti dalle stesse neoplasie (15,16) fornendo così un'opportunità per valutare non solo i rischi genetici delle patologie, ma anche studiare i fattori nutrizionali e ambientali cruciali per lo sviluppo dei tumori umani (17). Inoltre, grazie all'eventuale insorgenza di recidive e metastasi spontanee, le neoplasie canine mimano meglio la naturale progressione dei tumori umani rispetto agli altri modelli animali pre-clinici (18). Numerosi studi di comparazione dell'espressione genica hanno rilevato una stretta corrispondenza, in termini di genetica tumorale e bersagli molecolari, tra i tumori canini e umani (19-21) supportando così l'uso del modello tumorale canino come uno specchio per quello che accade nella biologia dei tumori umani. Infatti, sono stati identificati oncogeni *driver e* bersagli molecolari comuni, e de-regolazioni delle stesse vie di segnalazione intracellulare. Come conseguenza, molti farmaci adoperati nella clinica umana possono essere utilizzati anche per il trattamento dei tumori canini, poiché spesso inducono lo stesso tipo di risposta terapeutica nelle due specie, sottolineando il forte valore traslazionale dei modelli canini. Inoltre, i tumori che insorgono spontaneamente nei cani si sviluppano durante lunghi periodi e nel contesto di un sistema immunitario funzionante, consentendo quindi che avvengano le complesse interazioni tra il tumore e il sistema immunitario che tipicamente si verificano anche nell'uomo e che rendono le cellule neoplastiche sensibili alla pressione selettiva indotta dalla risposta immunologica spontanea. Inoltre, grazie all'esistenza di differenti razze nella popolazione canina, l'eterogeneità tra i pazienti con la medesima pa-

tologia riflette la diversità osservata nei tumori umani. L'insieme di tutte queste caratteristiche rendono la valutazione dell'efficacia di nuove immunoterapie anti-tumorali nei pazienti canini fortemente predittiva della loro efficacia nella clinica umana (22).

Gli studi sui tumori spontanei nei cani rappresentano un ottimo modello per investigazioni traslazionali riguardanti l'efficacia di nuove immunoterapie contro bersagli di interesse sia per la clinica veterinaria sia umana, con la speranza di raggiungere risultati positivi nei pazienti canini che si possano anche traslare rapidamente in altrettanto efficaci terapie per i pazienti umani. Pertanto, diversi tipi di tumori canini sono attualmente utilizzati negli studi di immuno-oncologia comparata; fra questi in particolare i linfosarcomi, osteosarcomi, melanomi e carcinomi mammari (12,22).

Il melanoma canino come "avatar" del melanoma umano

Il melanoma maligno (MM) è un tumore spontaneo nei cani ed è responsabile del 7% di tutti i tumori maligni (23). Nei cani affetti da MM la sede orale è quella maggiormente colpita (24), mentre altri siti coinvolti meno frequentemente sono le labbra (23%), la cute (11%) e le dita (8%). I melanomi orali sono considerati i più aggressivi con un'incidenza metastatica dell'80% a livello dei linfonodi regionali e di altri organi, inclusi i polmoni (24).

I trattamenti tradizionali per il MM canino prevedono la resezione chirurgica del tumore - associata o meno a radioterapia e/o chemioterapia - che è efficace nel controllare il tumore localmente nel 75% degli animali; tuttavia, il tasso di sopravvivenza a un anno non supera il 30% a causa delle metastasi (25-27). Generalmente il MM è diagnosticato in uno stadio avanzato, quando ormai la resezione del tumore è curativa solo in pochi casi. Pertanto, gli effetti delle terapie convenzionali per il trattamento del MM canino, così come accade per l'uomo, sono estremamente deludenti.

Sebbene differiscano in frequenza (28), i melanomi canini e umani mostrano numerose similitudini: si sviluppano nelle medesime sedi anatomiche e presentano caratteristiche istopatologiche e strutturali comuni (29). Differenti studi inoltre si sono focalizzati sull'identificazione di bersagli molecolari del MM canino, portando all'identificazione di mutazioni somatiche puntiformi e antigeni associati al tumore (TAA) comuni nel cane e nell'uomo, suggerendo che vie di segnalazione intracellulari e meccanismi molecolari condivisi in entrambe le specie contribuiscano alla progressione della patologia.

Proprio per tutte queste caratteristiche, i MM canini mimano in modo fedele l'evoluzione clinica della patologia umana, rappresentando quindi un "avatar" del corrispettivo tumore umano.

Sulla base di queste considerazioni, si pone come obiettivo fondamentale per la ricerca immuno-oncologica comparata l'identificazione di strategie terapeutiche di cui possano beneficiare i pazienti canini affetti da MM e che in seguito possano essere applicate anche ai pazienti umani.

La vaccinazione a DNA per il trattamento del melanoma maligno canino

Grazie all'importanza degli eventi immunologici che intervengono durante il processo tumorigenico e all'identificazione di numerosi TAA associati al melanoma, l'immunoterapia rappresenta una delle più interessanti opzioni terapeutiche per il MM. Differenti studi comparativi hanno portato all'identificazione di TAA condivisi tra il MM canino e umano (30,31), che possono quindi diventare il bersaglio di strategie immunoterapeutiche specifiche con un elevato potere traslazionale.

L'elevata versatilità, la facilità di produzione e il basso costo di produzione combinato con l'alta stabilità e la possibilità di scalabilità della dose, rendono i plasmidi a DNA uno strumento estremamente interessante in cui inserire il TAA di interesse per generare vaccini a DNA. Un vaccino a DNA è composto da un plasmide, che include l'intera o una parte della sequenza del TAA di interesse, sotto il controllo di un promotore che regoli la trascrizione del gene in cellule di mammifero, un segnale di terminazione della trascrizione genica e un gene per la resistenza antibiotica in cellule procariote (32). Lo scopo della vaccinazione a DNA è di potenziare la risposta del sistema immunitario propria del paziente contro un definito TAA e indurre quindi una memoria immunologica diretta contro le cellule tumorali (33,34). La vaccinazione a DNA si pone quindi come una strategia attraente da sviluppare e trasformare in una terapia anti-tumorale efficace (35). Tuttavia, i TAA sono molecole proprie dell'organismo, ovvero "*self*", spesso over-espresse dalle cellule neoplastiche ma non mutate, perciò sono tollerate dall'organismo e questo rappresenta uno dei maggiori ostacoli per il successo dei vaccini a DNA e per l'induzione di una risposta immunologica anti-tumorale efficace (fig. 1). Una delle strategie per superare questa limitazione e rompere quindi la tolleranza immunologica prevede l'utilizzo di vaccini a DNA xenogenici, ovvero codificanti un TAA differente (eterologo) da quello della specie di interesse, ma allo stesso tempo che possieda un elevato grado di omologia con il TAA "*self*" (omologo) (36,37). Questo sistema potrebbe garantire da un lato la rottura della tolleranza e dall'altro l'induzione di una risposta immunologica efficace contro il TAA bersaglio (fig. 1). La sperimentazione di questa strategia ha portato allo sviluppo del primo vaccino anti-tumorale approvato negli Stati Uniti (ONCEPT, commercializzato da Merial) per il trattamento dei cani con un MM orale di stadio II-III, controllato localmente mediante resezione chirurgica. Questo vaccino ha fornito risultati sperimentali incoraggianti (38,39), e sebbene la sua efficacia terapeutica sia stata recentemente discussa (40), la sua approvazione ha suscitato enorme entusiasmo nella comunità scientifica, stimolando lo sviluppo e la valutazione di altri vaccini diretti contro TAA del MM canino e umano.

La vaccinazione a DNA contro CSPG4

Lorda Mayayo *et al*. sono stati i primi a valutare l'espressione del proteoglicano condroitin solfato (CSPG)4 nel MM canino (41). Questo è un marker precoce di progressione tumorale, presente sulla superficie cellulare e altamente espresso in circa l'80% dei MM umani, dove regola la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali (42).

Lorda Mayayo *et al*. hanno identificato l'espressione del CSPG4 in circa il 60% dei MM canini (41), etichettandolo come un nuovo marcatore per la diagnosi di MM canini e come un promettente bersaglio immunoterapeutico. Questo ha dato inizio allo studio di un vaccino a DNA contro questa molecola in cani di proprietà affetti da MM orale spontaneo, di stadio II-III e CSPG4-positivo, controllato localmente in seguito a resezione chirurgica del tumore. In particolare, il vaccino a DNA utilizzato codifica per la forma umana, perciò xenogenica, dell'antigene CSPG4 al fine di rompere la tolleranza immunologica nei pazienti canini. Inoltre, per aumentare l'efficacia della vaccinazione a DNA, questa è associata a elettroporazione, una procedura estremamente sicura ed efficace sia nel cane sia nell'uomo (43,44), che induce una reazione infiammatoria a livello del sito di inoculo del DNA e la generazione di un ambiente pro-immunogenico efficace nell'induzione di una potente risposta immunologica (36,37).

Uno schema della procedura di vaccinazione a DNA associata a elettroporazione in un paziente canino affetto da MM è riportato in fig. 2. I dati sperimentali ottenuti suggeriscono che la vaccinazione a DNA contro la molecola CSPG4 umana è sicura ed efficace nel prolungare significativamente la sopravvivenza e il tempo libero da malattia dei pazienti canini affetti

da MM grazie all'induzione di una risposta anticorpale specifica non solo contro la molecola CSPG4 umana, ma anche contro la proteina canina (45,46). Grazie al forte potere traslazionale del modello canino, questo studio apre interessanti prospettive per la valutazione dell'efficacia di questa strategia immunoterapeutica nell'uomo.

Conclusioni

Lo sviluppo di modelli murini pre-clinici sempre più complessi ed elaborati ha permesso di ottenere fondamentali conoscenze riguardanti l'immunobiologia dei tumori. Tuttavia, questi modelli murini si sono dimostrati scarsamente prognostici e predittivi dei risultati clinici. Soprattutto nel campo dell'immunologia dei tumori, la selezione di un modello sperimentale che mimi il più fedelmente possibile la neoplasia umana è critico per predire la risposta all'immunoterapia nell'uomo.

In questo scenario, il valore dell'oncologia comparata sta acquisendo sempre maggior riconoscimento. Lo studio dei tumori che insorgono spontaneamente nei cani è, infatti, un potente "strumento" traslazionale per studiare la sicurezza e l'efficacia di nuove immunoterapie che potrebbero essere di enorme interesse nel panorama veterinario e clinico umano.

Bibliografia

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Cavallo, F., et al., *2011: the immune hallmarks of cancer.* Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(3): p. 319-26.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Couzin-Frankel, J., *Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy.* Science, 2013. **342**(6165): p. 1432-3.
5. Budhu, S., J. Wolchok, and T. Merghoub, *The importance of animal models in tumor immunity and immunotherapy*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **24**: p. 46-51.
6. Rubin, E.H. and D.G. Gilliland, *Drug development and clinical trials--the path to an approved cancer drug*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(4): p. 215-22.
7. Grosso, J.F. and M.N. Jure-Kunkel, *CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research*. Cancer Immun, 2013. **13**: p. 5.
8. McDermott, D.F. and M.B. Atkins, *PD-1 as a potential target in cancer therapy.* Cancer Med, 2013. **2**(5): p. 662-73.
9. Talmadge, J.E., et al., *Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer.* Am J Pathol, 2007. **170**(3): p. 793-804.
10. Herodin, F., et al., *Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology*. Eur Cytokine Netw, 2005. **16**(2): p. 104-16.
11. Paoloni, M.C. and C. Khanna, *Comparative oncology today*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2007. **37**(6): p. 1023-32; v.
12. Riccardo, F., et al., *The importance of comparative oncology in translational medicine*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(2): p. 137-48.
13. Gordon, I., et al., *The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway.* PLoS Med, 2009. **6**(10): p. e1000161.
14. Lequarre, A.S., et al., *LUPA: a European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs*. Vet J, 2011. **189**(2): p. 155-9.
15. Bukowski, J.A., D. Wartenberg, and M. Goldschmidt, *Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk*. J Toxicol Environ Health A, 1998. **54**(7): p. 579-91.
16. Mukaratirwa, S., et al., *Canine cutaneous neoplasms: prevalence and influence of age, sex and site on the presence and potential malignancy of cutaneous neoplasms in dogs from Zimbabwe*. J S Afr Vet Assoc, 2005. **76**(2): p. 59-62.
17. Waters, D.J. and K. Wildasin, *Cancer clues from pet dogs*. Sci Am, 2006. **295**(6): p. 94-101.
18. Mack, G.S., *Clinical trials going to the dogs: canine program to study tumor treatment, biology.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(3): p. 161-2.
19. Gordon, I.K. and C. Khanna, *Modeling opportunities in comparative oncology for drug development*. ILAR J, 2010. **51**(3): p. 214-20.
20. Rivera, P. and H. von Euler, *Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors*. Vet Pathol, 2011. **48**(1): p. 132-46.
21. Ranieri, G., et al., *A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors*

in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **88**(1): p. 187-97.
22. Pinho, S.S., et al., *Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis*. Transl Res, 2012. **159**(3): p. 165-72.
23. Smith, S.H., M.H. Goldschmidt, and P.M. McManus, *A comparative review of melanocytic neoplasms*. Vet Pathol, 2002. **39**(6): p. 651-78.
24. Bergman, P.J., *Canine oral melanoma*. Clin Tech Small Anim Pract, 2007. **22**(2): p. 55-60.
25. Freeman, K.P., et al., *Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997)*. J Vet Intern Med, 2003. **17**(1): p. 96-101.
26. Proulx, D.R., et al., *A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation*. Vet Radiol Ultrasound, 2003. **44**(3): p. 352-9.
27. Murphy, S., et al., *Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy*. Vet Comp Oncol, 2005. **3**(4): p. 222-9.
28. Spangler, W.L. and P.H. Kass, *The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia*. Vet Pathol, 2006. **43**(2): p. 136-49.
29. Simpson, R.M., et al., *Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res, 2014. **27**(1): p. 37-47.
30. Gillard, M., et al., *Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas*. Pigment Cell Melanoma Res, 2014. **27**(1): p. 90-102.
31. Fowles, J.S., C.L. Denton, and D.L. Gustafson, *Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma*. Vet Comp Oncol, 2015. **13**(3): p. 288-304.
32. Glenting, J. and S. Wessels, *Ensuring safety of DNA vaccines*. Microb Cell Fact, 2005. **4**: p. 26.
33. Cavallo, F., R.A. Calogero, and G. Forni, *Are oncoantigens suitable targets for anti-tumour therapy?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 707-13.
34. Eschenburg, G., et al., *DNA vaccination: using the patient's immune system to overcome cancer*. Clin Dev Immunol, 2010. **2010**: p. 169484.
35. Fioretti, D., et al., *DNA vaccines: developing new strategies against cancer*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 174378.
36. Cavallo, F., et al., *Xenogene vaccination in the therapy of cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(10): p. 1427-42.
37. Riccardo, F., et al., *Chimeric DNA Vaccines: An Effective Way to Overcome Immune Tolerance*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014.
38. Grosenbaugh, D.A., et al., *Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor*. Am J Vet Res, 2011. **72**(12): p. 1631-8.
39. Bergman, P.J., et al., *Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center*. Vaccine, 2006. **24**(21): p. 4582-5.
40. Ottnod, J.M., et al., *A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma*. Vet Comp Oncol, 2013. **11**(3): p. 219-29.

41. Mayayo, S.L., et al., *Chondroitin sulfate proteoglycan-4: a biomarker and a potential immunotherapeutic target for canine malignant melanoma*. Vet J, 2011. **190**(2): p. e26-30.
42. Campoli, M., S. Ferrone, and X. Wang, *Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4*. Adv Cancer Res, 2010. **109**: p. 73-121.
43. Aurisicchio, L., R. Mancini, and G. Ciliberto, *Cancer vaccination by electro-gene-transfer*. Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(10): p. 1127-37.
44. Low, L., et al., *DNA vaccination with electroporation induces increased antibody responses in patients with prostate cancer*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(11): p. 1269-78.
45. Riccardo, F., et al., *CSPG4-specific immunity and survival prolongation in dogs with oral malignant melanoma immunized with human CSPG4 DNA*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(14): p. 3753-62.
46. Piras, L.A., et al., *Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination*. Vet Comp Oncol, 2016.

LE TERAPIE A BERSAGLIO MOLECOLARE IN ONCOLOGIA COMPARATA: IL MASTOCITOMA CANINO COME MODELLO PER L'UTILIZZO DI INIBITORI SPECIFICI PER IL RECETTORE C-KIT

NICOLA ZIZZO[1], MONICA FIORENTINI[2], GIROLAMO RANIERI[3], ROSA PATRUNO[1]

[1]Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari; [2]Medico Veterinario Libero Professionista, Ravenna; [3]IRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II, Bari

Introduzione

I modelli di laboratorio murini sono stati molto utili, nelle ultime decadi, per lo studio dei processi biologici di iniziazione, promozione e progressione tumorale (1). Tali modelli tuttavia, come accennato precedentemente, presentano delle limitazioni quali per esempio l'omogeneità genetica, il difetto dell'immunità cellulo-mediata e sistemi enzimatici che li distinguono dai tumori che colpiscono altri animali e l'uomo. Nei modelli murini inoltre, la neoplasia viene indotta artificialmente e in breve tempo e non può essere sovrapponibile ai processi biologici tipici delle neoplasie umane come i periodi di latenza, le recidive, le metastasi ed eventuali risultati relativi a nuove applicazioni terapeutiche. Tutto ciò spiega perché scoperte interessanti ottenute nei modelli murini di laboratorio non si traducono molto spesso in applicazioni nei tumori umani (2). Inoltre gli animali da compagnia affetti da neoplasie spontanee presentano, rispetto ai modelli murini, dimensioni corporee maggiori e sono sottoposti ai medesimi fattori ambientali potenzialmente cancerogeni (3). In particolare tra i tumori che colpiscono la specie umana e quella canina esistono analogie a livello istologico, immunitario, dell'eterogeneità tumorale, nella capacità di dare metastasi a distanza (4) e anche dal punto di vista genomico dopo la caratterizzazione del loro genoma, che ha mostrato elevati livelli di omologia con quello umano (5). In particolare, alcuni studi pubblicati negli ultimi anni hanno evidenziato che oncogeni importanti nella cancerogenesi umana come MET, mTOR, BRCA, MDM2, Rb, p16 e p53 presentano livelli di omologia elevata con i medesimi oncogeni canini, e in quest'ultima specie sono altrettanto importanti per la patogenesi tumorale (6,7). Recentemente le stesse anomalie relative alle traslocazioni dei geni BCR-ABL tipiche della leucemia mieloide cronica sono state evidenziate sia nel cane sia nell'uomo, e le aberrazioni dell'oncogene c-Kit sono risultate importanti per la patogenesi di alcuni tumori sia umani sia canini, consentendo lo sviluppo di terapie a bersaglio molecolare in entrambe le specie contro questo recettore e anche verso recettori di fattori di crescita pro-angiogenetici (8-10).

Il proto-oncogene c-kit

Nel 1986 veniva pubblicato sulla rivista *Nature* la scoperta di un nuovo retrovirus felino isolato da un fibrosarcoma felino. Esso veniva chiamato, dal nome degli autori che lo scoprirono: virus del sarcoma felino 4 di Hardy-Zuckerman (HZ4-FeSV) (11). Dal sequenziamento del genoma virale si apprese che esso conteneva una sequenza genica ancora ignota che codificava per una proteina la di tipo *gag-kit* dal peso molecolare di 80.000 *daltons*. Da studi di omologia di sequenza fu riscontrato che questa proteina era simile d un recettore di membrana ad azione tirosina chinasico denominato c-Kit *receptor* (c-Kit) nelle cellule e v-Kit nelle sequenze isolate da virus. c-Kit è un proto-oncogene, filogeneticamente conservato nelle varie specie (12) e appartiene alla famiglia dei recettori ad attività tirosina chinasica il cui ligando è rappresentato dallo *stem cell factor* (SCF). L'interazione tra il ligando SCF e c-Kit regola

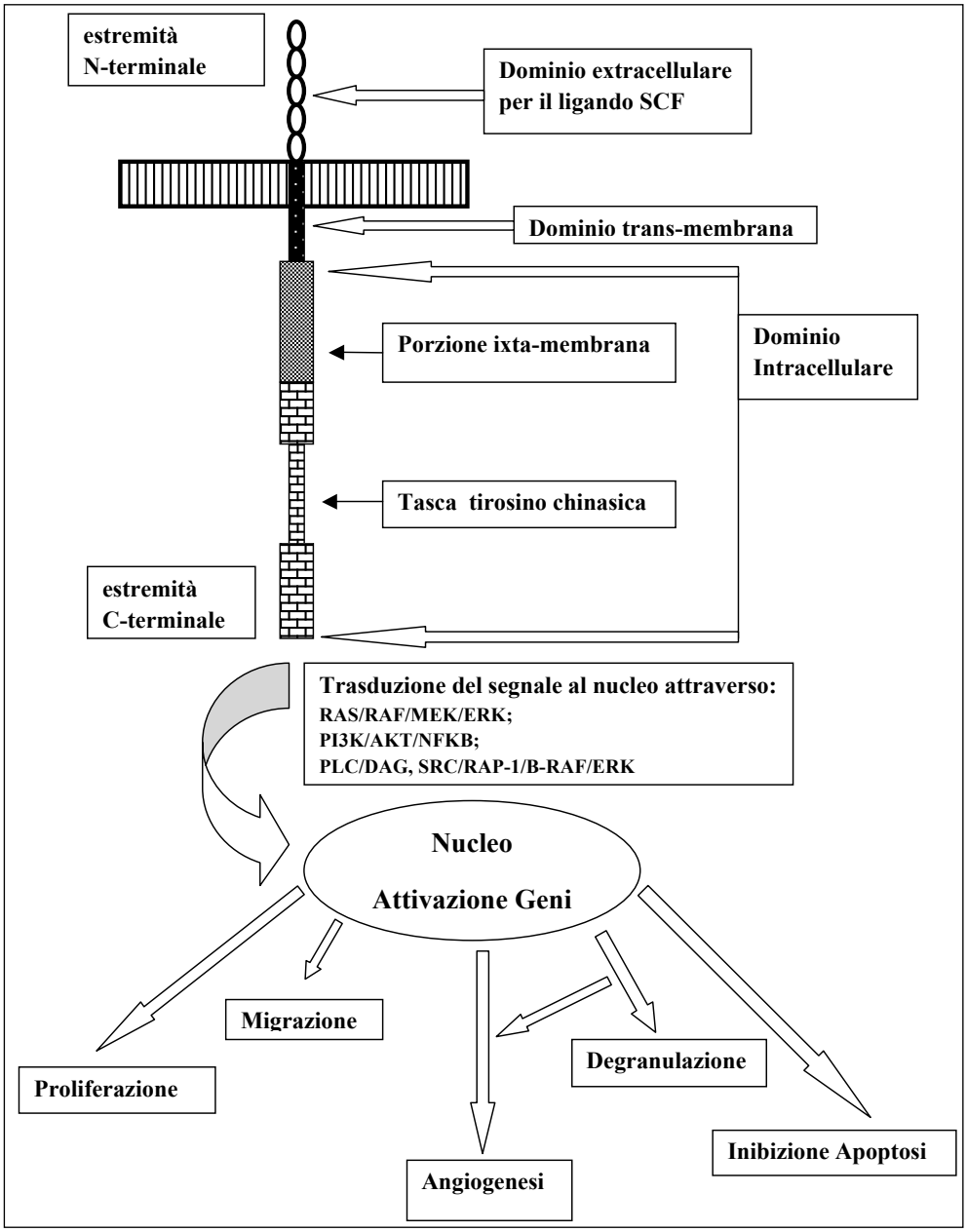


Fig. 1. Struttura molecolare del recettore c-Kit e relativi *pathways* intracellulari di trasduzione mediati dal recettore in seguito al legame con il fattore di crescita SCF.

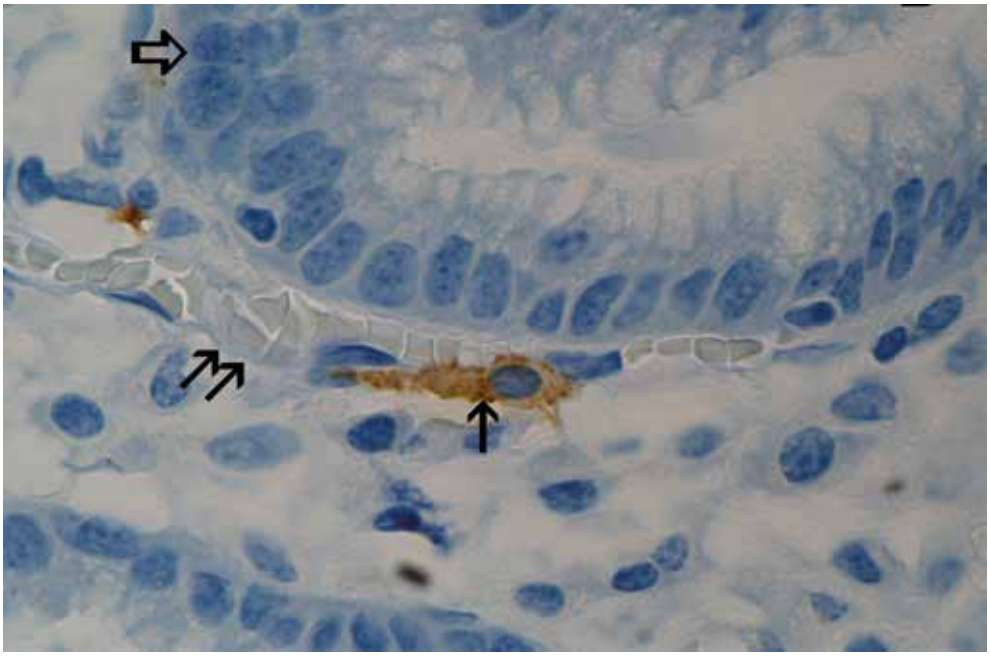


Fig. 2. Uomo, mucosa normale di colon umano. Colorazione immunoistochimica anti-c-Kit. Notare la positività di un mastocita in prossimità di un microvaso (ingrandimento 400x)

funzioni importanti per le cellule quali crescita, motilità, differenziazione, proliferazione, degranulazione e in alcuni contesti del microambiente anche l'angiogenesi (13).

c-Kit presenta un dominio extracellulare composto da 5 elementi di tipo immunoglobulinico, un dominio trans-membrana citoplasmatico e un dominio intra-cellulare composto dalla porzione iuxta-membrana e da una porzione dove avviene la fosforilazione di un residuo di tirosina (fig. 1) (14).

Le aberrazioni del c-Kit includono mutazioni, delezioni e duplicazioni. Esse sono state caratterizzate in alcuni tumori umani come nel GIST *(gastro intestinal stromal tumour)* (15). Tra le aberrazioni più importanti si riportano le mutazioni presenti nel quinto elemento del dominio extracellulare a carico degli esoni 8 e 9 (51), la delezione nel dominio iuxta-membrana a carico dell'esone 11 (V559D) la delezione nel dominio chinasico a carico dell'esone 17 (16).

Fisiologicamente l'attivazione del c-Kit nella sua forma *wild type* da parte dello SCF comporta la fosforilazione del dominio kinasico e la trasduzione del segnale che attiva una serie di *pathways* intracellulari quali RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/NFKB, PLC/DAG, SRC/RAP-1/B-RAF/ERK che, utilizzando intermedi di fosforilazione intracellulare, trasportano il segnale al nucleo della cellula (fig. 1). Questo evento è transitorio e si esaurisce al temine della cascata fosforilativa e degli effetti da essa prodotti e già citati nel paragrafo precedente (17).

In seguito a mutazioni a carico del gene c-Kit, esso codifica per un recettore tirosino chinasico costitutivamente attivato e in grado di trasmettere il segnale continuamente al nucleo in assenza della presenza di SCF. In questo modo la cellula acquista un vantaggio proliferativo che può sfociare nello sviluppo del tumore, come ad esempio nei GIST e nel mastocitoma canino (18,19).

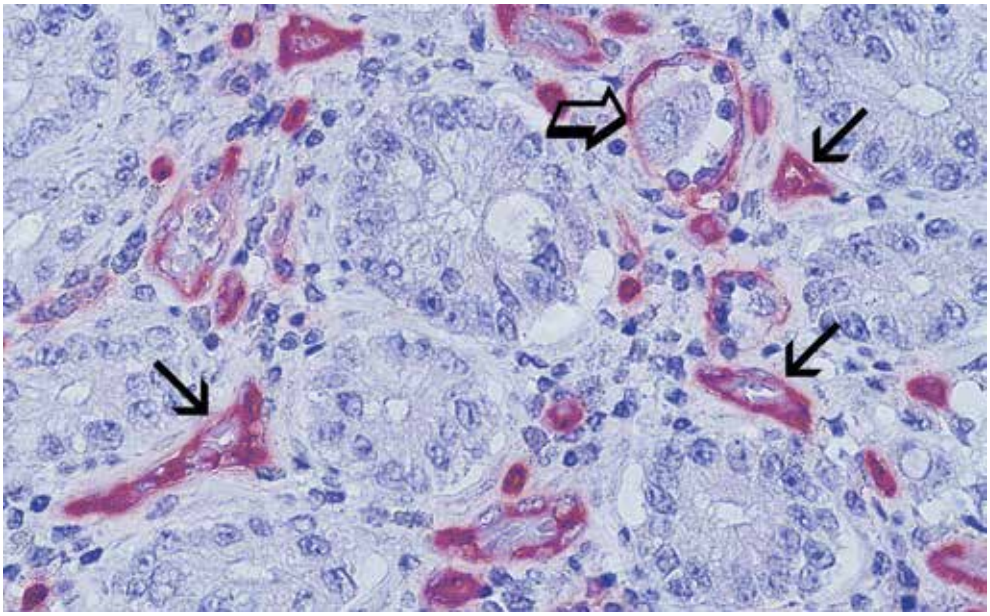


Fig. 3. Uomo, carcinoma intestinale. Colorazione immunoistochimica mediante anticorpo CD34 specifica per l'endotelio vascolare. Notare la positività a livello dei microvasi (ingr. 200x)

Il mastocitoma canino come modello di tumore spontaneo c-Kit dipendente

I mastociti sono classicamente conosciuti come effettori delle reazioni allergiche e anafilattiche per via della liberazione dei mediatori contenuti nei loro granuli secretori (20). I mastociti sono situati in stretto rapporto topografico con i vasi sanguigni (fig. 2) e questo costituisce il substrato anatomo-funzionale che supporta il loro coinvolgimento nelle reazioni immunitarie e, più di recente, quali cellule capaci di stimolare il processo angiogenetico (fig. 3) in virtù dei mediatori pro-angiogenetici in essi contenuti. Gran parte delle funzioni e delle attività di tali cellule sono modulate da c-Kit attraverso il legame con il fattore SCF (21). In seguito all'attivazione di c-Kit, il mastocita risulta attivato ed è in grado di rilasciare i granuli e stimolare in parte l'angiogenesi. Diversi studi pubblicati hanno dimostrato che l'incremento dei mastociti nel microambiente tumorale si correla con l'incremento dell'angiogenesi tumorale (figg. 4 e 5) (22,23). Dal momento che non esiste un modello sperimentale valido per lo studio delle attività mastocitarie (24) nella patogenesi tumorale, il mastocitoma cutaneo canino può rappresentare un modello spontaneo utile per lo studio dei tumori indotti da aberrazioni dell'oncogene c-Kit e per lo studio dell'angiogenesi indotta dai mastociti (25). I mastocitomi canini presentano un'incidenza del 7-21% dei tumori cutanei canini e sono classificati in tre sottogruppi secondo la classificazione di Patnaik: ben differenziati (G1), a differenziazione intermedia (G2) e scarsamente differenziati (G3) (26). I mastocitomi G1 e una quota di mastocitomi G2 costituiscono malattie per lo più ad andamento benigno, mentre i mastocitomi G3 sono rappresentati da tumori maligni con elevata capacità di dare metastasi. E' stato dimostrato che nei mastocitomi, in particolare nel sottogruppo dei mastocitomi G3, vi sono aberrazioni riguardanti l'oncogene c-Kit che codifica per un recettore costitutivamente attivato e, pertanto, in grado di far degranulare in continuazione i mastociti tumorali (27). Dati

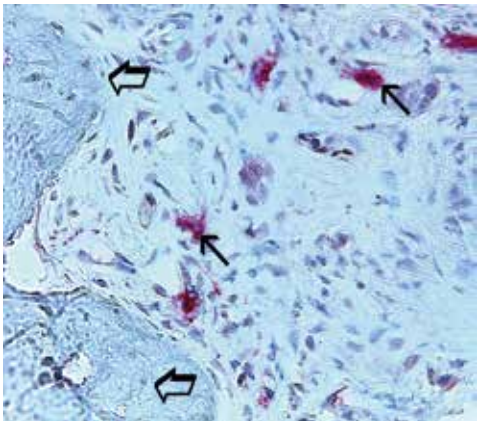


Fig. 4. Uomo. Metastasi da carcinoma gastrico in sede ossea. Colorazione immunoistochimica con anticorpo anti-triptase, fattore angiogenetico rilasciato dai mastociti. Notare la positività a livello dei mastociti (ingrandimento 400x)

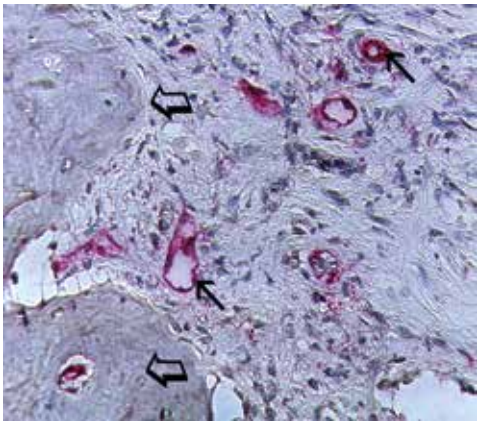


Fig. 5. Uomo. Metastasi da carcinoma gastrico in sede ossea. Colorazione immunoistochimica con anticorpo anti-CD34 specifica per l'endotelio vascolare (ingrandimento 400x)

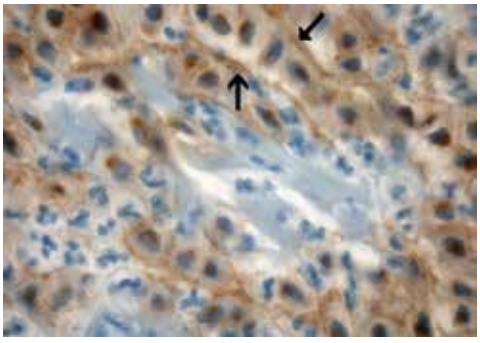


Fig. 6. Cane. Mastocitoma cutaneo. Colorazione immunoistochimica anti-c-KIT. Notare la positività di membrana indicata dalla freccia (ingrandimento 1000x)

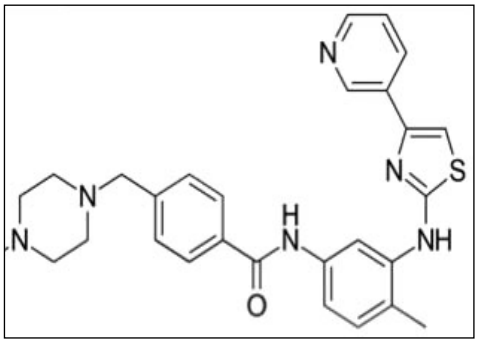


Fig. 7. Struttura chimica del masitinib

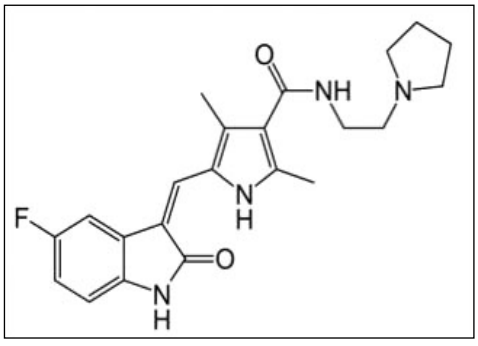


Fig. 8. Struttura chimica del toceranib.

sperimentali ottenuti dal nostro gruppo dimostrano che i livelli del peptide pro-angiogenetico *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dosati negli estratti tumorali a fresco (*cytosol*) e nel plasma ricco di piastrine attivate sono più elevati nel sottogrupo di cani affetti da mastocitoma G3 rispetto ai sottogruppi di cani affetti da mastocitoma G1 e G2 (28). Sulla base dei dati presenti in letteratura che dimostrano come le aberrazioni dell'oncogene c-Kit sono più frequenti nei mastocitomi G3 rispetto ai mastocitomi G1 e G2, i nostri risultati suggeriscono che i livelli di VEGF elevato nei mastocitomi G3 possano correlarsi alle aberrazioni dell'oncogene c-Kit [29]. Abbiamo pertanto suggerito come il dosaggio dei livelli di VEGF nei cani affetti dalla patologia oncologica possa essere un marcatore tumorale di malignità della neoplasia. D'altro canto mutazioni simili dell'oncogene c-Kit sono state identificate nei GIST umani che derivano, sotto il profilo istogenetico, dalle cellule di *Cajal* dell'intestino e in altre neoplasie umane (30-32). Di conseguenza, i mastocitomi si candidano come modelli utili per studiare il ruolo dei mastociti nell'angiogenesi (33), e il blocco della loro degranulazione attraverso l'inibizione del recettore c-Kit ottenuto con farmaci anti-tirosino chinasi costituisce una strategia anti-angiogenetica degna di continui approfondimenti e sperimentazioni cliniche (34,35). In fig. 6 è rappresentato un preparato immunoistochimico di mastocitoma canino positivo a c-Kit.

La terapia a bersaglio molecolare con il masitinib (AB1010) nel mastocitoma canino

Il masitinib mesilato è una formulazione orale biodisponibile del sale di masitinib che ha la capacità di legare e inibire in maniera selettiva sia la forma non mutata *wild type* (WT) di c-Kit sia la forma di c-Kit che presenta le aberrazioni cromosomiche e quindi costitutivamente attivate (36). Il masitinib si inserisce nel sito intracellulare di legame dell'ATP di c-kit realizzando l'inattivazione del recettore attraverso una conformazione non attiva. Masitinib è in grado di inibire anche altri recettori tirosino chinasici quali il *platelet derived growth factor receptor* (PDGFRs) e il *fibroblast growth factor receptor* (FGFRs); tuttavia questa ultima inibizione risulta essere di secondaria importanza (37). La struttura chimica del masitinib è riportata in fig. 7.

Studi eseguiti su modelli murini hanno dimostrato che questa molecola è in grado di inibire la crescita tumorale con un profilo di tossicità tollerabile. Sulla base di questi dati il masitinib è stato successivamente somministrato oralmente negli animali da compagnia, nei quali ha mostrato un profilo di tossicità accettabile con un'emivita di 5 ore (38). Dopo questi *trials* clinici di fase 1 e 2, il masitinib è stato clinicamente sviluppato e approvato per il trattamento dei mastocitomi canini G2 e G3 ed è il primo farmaco antitumorale a bersaglio molecolare approvato in medicina oncologica veterinaria (39). *Il trial* clinico, eseguito in doppio cieco, randomizzato, di fase 3 è stato condotto su 202 cani affetti da mastocitoma G2 e G3. In questo studio circa la metà dei cani ha ricevuto la somministrazione di placebo, mentre l'altra metà ha ricevuto la somministrazione di masitinib (12,5 mg/kg/die per os) (40). Gli animali che hanno ricevuto il masitinib hanno avuto il tempo libero da malattia più lungo (DFI) rispetto agli animali che hanno ricevuto il placebo. Il masitinib è utilizzato in umana in pazienti affetti da GIST, mastocitosi e cancro al pancreas (41-43). Il masitinib è attualmente commercializzato per uso veterinario come Kinavet negli Stati Uniti d'America, e in Europa come Masivet sotto forma di compresse da 50 e 150 mg. Le indicazioni terapeutiche per l'impiego del masitinib sono cani affetti da mastocitoma di grado 2 e 3 secondo Patnaik, il cui tumore non può essere rimosso chirurgicamente e dopo analisi molecolare che confermi un'aberrazione dell'oncogene c-Kit. Il masitinib viene somministrato una volta al giorno fino a progressione di malattia o a tossicità non accettabile.

L'utilizzo del toceranib (SU11654) nella terapia a bersaglio molecolare contro i recettori c-KIT, VEGFR e PDGFR

ll toceranib fosfato (SU11654) è un nuovo indolinone inibitore la cui caratteristica è di inibire contemporaneamente la fosforilazione di differenti recettori con attività tirosino chinasica quali c-Kit, VEGFR-2 e PDGFR (44). Il toceranib svolge pertanto attività antitumorale sia diretta sia indiretta inibendo il processo angiogenetico. Il toceranib inibisce c-Kit, VEGFR e PDGFR sia in saggi di tipo biochimico sia in saggi effettuati su linee cellulari; in particolare il toceranib esercita un effetto antiproliferativo diretto sulle cellule endoteliali *in vitro* (45) e provoca l'arresto del ciclo cellulare e la conseguente morte per apoptosi in linee cellulari esprimenti mutazioni del gene c-Kit. La struttura chimica del masitinib è riportata in fig. 8.

Nei cani sani la somministrazione orale a giorni alterni di toceranib alla posologia di 3,25 mg/kg ha dimostrato un'emivita di 17 ore del farmaco, con un picco della concentrazione plasmatica di circa 6 ore dalla somministrazione con un valore pari a 108 ng/ml. La biodisponibilità del toceranib è risultata essere pari a 86% mentre la sua presenza è stata elevata nel tessuto linfatico, midollo osseo, rene, surrene, polmone, milza, pancreas e cute (46). La farmacocinetica è risultata di tipo lineare in seguito a somministrazione di dosi comprese tra 3,25 e 5 mg/kg (47). Non sono state dimostrate differenze farmacocinetiche tra cani maschi e femmine. Il principale metabolita del toceranib è risultato essere un N-ossido derivato. Dopo somministrazione orale il 92% del toceranib è escreto con le feci e il 7% con le urine.

In uno studio di Fase I, 57 cani con tumori spontanei avanzati hanno ricevuto dosi crescenti di toceranib come terapia orale. Il farmaco è risultato sicuro e ben tollerato fino alla dose di 3,25 mg/kg somministrata a giorni alterni. Sono state dimostrate risposte antitumorali obiettive in 16 cani e stabilizzazioni di malattia in 15 cani (48). Questo studio ha rappresentato una pietra miliare per disegnare protocolli di somministrazione dei farmaci inibitori delle tirosino-chinasi perché ha dimostrato che tali farmaci possono essere somministrati continuativamente senza la necessita di interruzioni. Nell'uomo questo inibitore che prende il nome di sunitinib viene utilizzato nel trattamento del carcinoma renale (49). In seguito il toceranib è stato somministrato in un trial clinico di fase III nel quale cani affetti da mastocitoma, di grado 2-3 secondo Patnaik, recidivato, sono stati randomizzati a ricevere toceranib alla posologia di 3,25 mg/kg o placebo nell'altro gruppo di controllo (50). Il tasso di risposta globale dei 145 cani che avevano ricevuto il toceranib è stato del 42,8% e ha compreso 21 risposte complete e 41 risposte parziali con una durata mediana della risposta di 12 settimane e una durata mediana del tempo alla progressione oncologica di 18 settimane. Il toceranib è attualmente commercializzato con il marchio unico di Palladia e le indicazione all'utilizzo sono cani affetti da mastocitoma cutaneo di grado 2 o 3 secondo Patnaik, recidivati, con o senza coinvolgemento linfonodale. Esso è disponibile sotto forma di compresse da 10 mg, 15 mg e 50 mg e l'assunzione non è condizionata dal cibo; la terapia è somministrata fino a progressione di malattia o a tossicità non accettabile.

Spettro di tossicità degli inibitori tirosino chinasici

In oncologia veterinaria la qualità di vita è un aspetto importante, così come lo è in umana, che condiziona la decisione terapeutica. Seppure con uno spettro di tossicità differente, anche gli inibitori di tipo tirosino-chinasico possono causare effetti collaterali sulle cellule normali, in quanto queste ultime possono esprimere in alcuni tessuti quei recettori tirosino chinasici che sono dis-regolati nelle cellule tumorali e che si vanno a inibire farmacologicamente (51). Nei pazienti trattati con masitinib e toceranib possiamo riscontrare alcuni effetti collaterali quali anoressia, nausea, vomito, diarrea e sanguinamenti gastro-intestinali. Se le tossicità indotte sono di grado elevato, e la terapia sintomatica e di supporto è inefficace, bi-

sogna prendere in considerazione le possibili riduzioni posologiche degli inibitori o l'interruzione transitoria della loro somministrazione. Nello specifico il toceranib può inoltre indurre una moderata neutropenia con un numero di neutrofili che non scende al disotto dei 1500/mm^3 e che non si traduce, sotto il profilo clinico, in un'aumentata suscettibilità alle infezioni (52). In alcuni cani possono evidenziarsi manifestazioni muscolari crampiformi il cui trattamento consiste nella somministrazione di corticosteroidi o nella sospensione transitoria di uno o due giorni della somministrazione dell'inibitore tirosino chinasico. D'altro canto il masitinib può indurre nefropatia con perdita di proteine in una piccola percentuale di pazienti, la cui patogenesi non è nota (53).

Osservazioni conclusive

I cani affetti da neoplasie maligne costituiscono dei modelli spontanei importanti per studi di oncologia comparata (54-56). La valutazione di inibitori tirosino chinasici di nuova generazione nei cani oncologici costituisce un'opportunità unica per valutare indici terapeutici, sicurezza ed efficacia degli stessi. Al di fuori del modello oncologico canino, una parte di queste valutazioni non possono essere disponibili se non con gli studi sull'uomo così detti *first in human*. Per esempio lo spettro e la natura degli effetti collaterali indotti dal masitinib e dal toceranib sono molto simili a quelli indotti dai diversi inibitori tirosino chinasici somministrati nell'uomo (57).

Gli studi sul modello canino potrebbero aiutare a identificare protocolli di somministrazione e posologie con indice di tollerabilità più elevato e risposte terapeutiche migliori. Il *follow-up* degli animali trattati permetterebbe di valutare il tipo di recidive e della progressione tumorale, fornendo una base per la somministrazione nell'uomo degli stessi inibitori o di inibitori analoghi (58). Risulta evidente che tutto ciò non è possibile con i topi da laboratorio, che hanno periodi di vita limitati e non presentano l'eterogeneità tumorale indispensabile per comprendere la progressione tumorale e la risposta a terapie specifiche; cani affetti da mastocitoma e che presentano mutazioni dell'oncogene c-Kit hanno complessivamente percentuali di risposta del 69% rispetto al 37% degli animali che non le presentano (59).

In conclusione possiamo affermare che il modello canino rappresenta un ottimo modello per studi comparativi relativi allo sviluppo dei farmaci oncologici e più nello specifico di nuovi farmaci biologici quali gli inibitori tirosino chinasici.

Bibliografia

1. Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. SCID mouse models to study human cancer pathogenesis and approaches to therapy: potential, limitations, and future directions. Trends in Immunology 2001;22:386–93.
2. Kung AL. Practices and pitfalls of mouse cancer models in drug discovery. Advances in Cancer Research 2007;96:191–212.
3. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. Cancer Investigation
4. Ambrosini V, Quarta C, Nanni, et al. Small animal PET in oncology: the road from bench to bedside. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals 2009;24:277–85.
5. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature 2005;438:803–19.
6. Mendoza S, Konishi T, Dernell WS, et al. Status of the p53, Rb and MDM2 genes in canine osteosarcoma. Anticancer Research 1998;18:4449–53.
7. Rivera P, Melin M, Biagi T, et al. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. Cancer Research 2009;69:8770–4.
8. Gregory-Bryson E, Bartlett E, Kiupel M, et al. Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11. BMC 2010;10:559.
9. London CA. Small molecule inhibitors in veterinary oncology practice. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2014 Sep;44(5):893-908.
10. Deplanque G, Demarchi M, Hebbar M, Flynn P, Melichar B, Atkins J, Nowara E, Moyé L, Piquemal D, Ritter D, Dubreuil P, Mansfield CD, Acin Y, Moussy A, Hermine O, Hammel P. A randomized, placebo-controlled phase III trial of masitinib plus gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer. Ann Oncol. 2015 Jun;26(6):1194-200
11. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, Snyder HW Jr, Brodeur D, Zuckerman EE, Hardy WD. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. Nature. 1986 Apr 3-9;320(6061):415-21.
12. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. Nature. 1988 Sep 1;335(6185):88-9.
13. Galli SJ, Tsai M, Wershil BK. The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. Am J Pathol. 1993 Apr;142(4):965-74
14. Blechman JM, Lev S, Givol D, Yarden Y. Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor. Stem Cells. 1993 Jul;11 Suppl 2:12-21
15. Kang W, Zhu C, Yu J, Ye X, Ma Z. KIT gene mutations in gastrointestinal stromal tumor. Front Biosci (Landmark Ed). 2015 Jun 1;20:919-26
16. Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, Kristensen TK, Kluin-Nelemans HC, Hermine O, Dubreuil P, Sperr WR, Hartmann K, Gotlib J, Cross NC, Haferlach T, Garcia-Montero A, Orfao A, Schwaab J, Triggiani M, Horny HP, Metcalfe DD, Reiter A, Valent P. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. Leukemia. 2015 Jun;29(6):1223-32.
17. Roberts R, Govender D. Gene of the month: KIT. J Clin Pathol. 2015 Sep;68(9):671-4.
18. Antonescu CR. The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. J Pathol. 2011 Jan;223(2):251-61
19. Ranieri G, Marech I, Pantaleo M, Piccinno M, Roncetti M, Mutinati M, Rizzo A, Gadaleta CD, Introna M, Patruno R, Sciorsci RL. In vivo model for mastocytosis: A comparative review. Crit Rev Oncol Hematol. 2015 Mar;93(3):159-69.

20. Mukai K, Tsai M, Starkl P, Marichal T, Galli SJ. IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms. Semin Immunopathol. 2016 Sep;38(5):581-603
21. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. Int J Biochem Cell Biol. 1999 Oct;31(10):1037-51.
22. [Ammendola M, Sacco R, Sammarco G, Piardi T, Zuccalà V, Patruno R, Zullo A, Zizzo N, Nardo B, Marech I, Crovace A, Gadaleta CD, Pessaux P, Ranieri G. Mast cells positive to tryptase, endothelial cells positive to protease-activated receptor-2, and microvascular density correlate among themselves in hepatocellular carcinoma patients who have undergone surgery. Onco Targets Ther. 2016 Jul 21;9:4465-71.
23. [Ammendola M, Patruno R, Sacco R, Marech I, Sammarco G, Zuccalà V, Luposella M, Zizzo N, Gadaleta C, Porcelli M, Gadaleta CD, Ribatti D, Ranieri G. Mast cells positive to tryptase and tumour-associated macrophages correlate with angiogenesis in locally advanced colorectal cancer patients undergone to surgery. Expert Opin Ther Targets. 2016;20(5):533-40
24. A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. Ranieri G, Gadaleta CD, Patruno R, Zizzo N, Daidone MG, Hansson MG, Paradiso A, Ribatti D. Crit Rev Oncol Hematol. 2013 Oct;88(1):187-97.
25. Marech I, Patruno R, Zizzo N, Gadaleta C, Introna M, Zito AF, Gadaleta CD, Ranieri G. Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: where we are? Crit Rev Oncol Hematol. 2014 Jul;91(1):98-111. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.12.011
26. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Vet Pathol. 1984 Sep;21(5):469-74.
27. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Nakagawa T, Ohno K, Sasaki N, Sugano S, Tsujimoto H. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell tumor cell lines. Vet Immunol Immunopathol. 2010 Oct 15;137(3-4):208-16. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.05.009. Epub 2010 May 31.
28. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D, Ranieri G. VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. J Cell Mol Med. 2009 Mar;13(3):555-61
29. Riva F, Brizzola S, Stefanello D, Crema S, Turin L. A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma. J Vet Diagn Invest. 2005 Jul;17(4):385-8.
30. Yan L, Zou L, Zhao W, Wang Y, Liu B, Yao H, Yu H. Clinicopathological significance of c-KIT mutation in gastrointestinal stromal tumors: a systematicreview and meta-analysis. Sci Rep. 2015 Sep 9;5:13718.
31. Postow MA, Carvajal RD. Therapeutic implications of KIT in melanoma. Cancer J. 2012 Mar-Apr;18(2):137-41.
32. Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, Kristensen TK, Kluin-Nelemans HC, Hermine O, Dubreuil P, Sperr WR, Hartmann K, Gotlib J, Cross NC, Haferlach T, Garcia-Montero A, Orfao A, Schwaab J, Triggiani M, Horny HP, Metcalfe DD, Reiter A, Valent P. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. Leukemia. 2015 Jun;29(6):1223-32.
33. [33] Ranieri G, Passantino L, Patruno R, Passantino G, Jirillo F, Catino A, Mattioli V, Gadaleta C, Ribatti D. un;29(6):1223-32. The dog mast cell tumour as a model to study the relationship between angiogenesis, mast celldensity and tumour malignancy. Oncol Rep. 2003 Sep-Oct;10(5):1189-93.

34. Patruno R, Marech I, Zizzo N, Ammendola M, Nardulli P, Gadaleta C, Introna M, Capriuolo G, Rubini RA, Ribatti D, Gadaleta CD, Ranieri G. c-Kit expression, angiogenesis, and grading in canine mast cell tumour: a unique model to study c-Kit driven human malignancies. Biomed Res Int. 2014;2014:730246
35. Ranieri G, Marech I, Pantaleo M, Piccinno M, Roncetti M, Mutinati M, Rizzo A, Gadaleta CD, Introna M, Patruno R, Sciorsci RL. In vivo model for mastocytosis: A comparative review. Crit Rev Oncol Hematol. 2015 Mar;93(3):159-69.
36. Dubreuil P, Letard S, Ciufolini M, Gros L, Humbert M, Castéran N, Borge L, Hajem B, Lermet A, Sippl W, Voisset E, Arock M, Auclair C, Leventhal PS, Mansfield CD, Moussy A, Hermine O Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. PLoS One. 2009 Sep 30;4(9):e7258
37. Humbert M, de Blay F, Garcia G, Prud'homme A, Leroyer C, Magnan A, Tunon-de-Lara JM, Pison C, Aubier M, Charpin D, Vachier I, Purohit A, Gineste P, Bader T, Moussy A, Hermine O, Chanez P. Masitinib, a c-kit/PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor, improves disease control in severe corticosteroid-dependent asthmatics. Allergy. 2009 Aug;64(8):1194-201
38. [Bellamy F, Bader T, Moussy A, Hermine O. Pharmacokinetics of masitinib in cats. Vet Res Commun. 2009 Dec;33(8):831-7.
39. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, Powers B, Leventhal PS, Kinet JP, Palmerini F, Dubreuil P, Moussy A, Hermine O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. J Vet Intern Med. 2008 Nov-Dec;22(6):1301-9.
40. Hahn KA, Legendre AM, Shaw NG, Phillips B, Ogilvie GK, Prescott DM, Atwater SW, Carreras JK, Lana SE, Ladue T, Rusk A, Kinet JP, Dubreuil P, Moussy A, Hermine O. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. Am J Vet Res. 2010 Nov;71(11):1354-61.
41. Adenis A, Blay JY, Bui-Nguyen B, Bouché O, Bertucci F, Isambert N, Bompas E, Chaigneau L, Domont J, Ray-Coquard I, Blésius A, Van Tine BA, Bulusu VR, Dubreuil P, Mansfield CD, Acin Y, Moussy A, Hermine O, Le Cesne A. Masitinib in advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST) after failure of imatinib: a randomized controlled open-label trial. Ann Oncol. 2014 Sep;25(9):1762-9.
42. Depression in patients with mastocytosis: prevalence, features and effects of masitinib therapy. Moura DS, Sultan S, Georgin-Lavialle S, Pillet N, Montestruc F, Gineste P, Barete S, Damaj G, Moussy A, Lortholary O, Hermine O. PLoS One. 2011;6(10):e26375
43. [43] Deplanque G, Demarchi M, Hebbar M, Flynn P, Melichar B, Atkins J, Nowara E, Moyé L, Piquemal D, Ritter D, Dubreuil P, Mansfield CD, Acin Y, Moussy A, Hermine O, Hammel P. A randomized, placebo-controlled phase III trial of masitinib plus gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer. Ann Oncol. 2015 Jun;26(6):1194-200
44. Liao AT, Chien MB, Shenoy N, Mendel DB, McMahon G, Cherrington JM, London CA. Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. Blood. 2002 Jul 15;100(2):585-93.
45. Bernabe LF, Portela R, Nguyen S, Kisseberth WC, Pennell M, Yancey MF, London CA. Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. BMC Vet Res. 2013 Sep 30;9:190. doi: 10.1186/1746-6148-9-190.
46. Yancey MF, Merritt DA, White JA, Marsh SA, Locuson CW. Distribution, metabolism, and excretion of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in dogs. J Vet Pharmacol Ther. 2010 Apr;33(2):154-61

47. Yancey MF, Merritt DA, Lesman SP, Boucher JF, Michels GM. Pharmacokinetic properties of toceranib phosphate (Palladia, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in laboratory dogs and dogs with mast cell tumors. J Vet Pharmacol Ther. 2010 Apr;33(2):162-71.
48. London C, Mathie T, Stingle N, Clifford C, Haney S, Klein MK, Beaver L, Vickery K, Vail DM, Hershey B, Ettinger S, Vaughan A, Alvarez F, Hillman L, Kiselow M, Thamm D, Higginbotham ML, Gauthier M, Krick E, Phillips B, Ladue T, Jones P, Bryan J, Gill V, Novasad A, Fulton L, Carreras J, McNeill C, Henry C, Gillings S. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia(®)) in solid tumours. Vet Comp Oncol. 2012 Sep;10(3):194-205.
49. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ, Rini BI. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2006 Jan 1;24(1):16-24.
50. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, Boucher JF, Rusk AW, Rosenberg MP, Henry CJ, Mitchener KL, Klein MK, Hintermeister JG, Bergman PJ, Couto GC, Mauldin GN, Michels GM. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. Clin Cancer Res. 2009 Jun 1;15(11):3856-65
51. Bernabe LF, Portela R, Nguyen S, Kisseberth WC, Pennell M, Yancey MF, London CA. Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. BMC Vet Res. 2013 Sep 30;9:190. doi: 10.1186/1746-6148-9-190
52. London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, Downing S, Post G, Boucher J, Shenoy N, Mendel DB, McMahon G, Cherrington JM. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. Clin Cancer Res. 2003 Jul;9(7):2755-68
53. Smrkovski OA, Essick L, Rohrbach BW, Legendre AM. Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. Vet Comp Oncol. 2015 Sep;13(3):314-21.
54. Zizzo N, Patruno R, Zito FA, Di Summa A, Tinelli A, Troilo S, Misino A, Ruggieri E, Goffredo V, Gadaleta CD, Ranieri G. Vascular endothelial growth factor concentrations from platelets correlate with tumor angiogenesis and grading in a spontaneous canine non-Hodgkin lymphoma model. Leuk Lymphoma. 2010 Feb;51(2):291-6
55. Patruno R, Zizzo N, Zito AF, Catalano V, Valerio P, Pellecchia V, D'Errico E, Mazzone F, Ribatti D, Ranieri G. Microvascular density and endothelial area correlate with Ki-67 proliferative rate in the canine non-Hodgkin's lymphoma spontaneous model. Leuk Lymphoma. 2006 Jun;47(6):1138-43.
56. Ranieri G, Patruno R, Lionetti A, Di Summa A, Mattioli E, Bufo P, Pellecchia A, Ribatti D, Zizzo N. Endothelial area and microvascular density in a canine non-Hodgkin's lymphoma: an interspecies model of tumor angiogenesis. Leuk Lymphoma. 2005 Nov;46(11):1639-43.
57. Khanna C, Gordon I. Catching cancer by the tail: new perspectives on the use of kinase inhibitors. Clin Cancer Res. 2009 Jun 1;15(11):3645-7.
58. Bavcar S, Argyle DJ. Receptor tyrosine kinase inhibitors: molecularly targeted drugs for veterinary cancer therapy. Vet Comp Oncol. 2012 Sep;10(3):163-73.
59. Small molecule inhibitors in veterinary oncology practice. London CA. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2014 Sep;44(5):893-908.

I TELEOSTEI QUALI MODELLO DI STUDIO IN ONCOLOGIA COMPARATA

FABIO MARINO[1], GIOVANNI LANTERI[2], BATTESIMO MACRÌ[2]

[1] Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; [2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina

I tumori dei pesci sono stati oggetto di continue ricerche in considerazione del fatto che questi animali risultano assai utili per la valutazione della carcinogenicità delle sostanze chimiche, dei meccanismi a essa relativi e alla determinazione dei fattori genetici che regolano l'oncogenesi. Ed è proprio sul loro ruolo di bioindicatori che è stata essenzialmente focalizzata l'attenzione da parte degli studiosi di tossicologia e di patologia comparata, potendo i pesci essere considerati valide sentinelle ambientali per l'evidenziazione degli agenti carcinogenetici potenzialmente nocivi anche per gli uomini e gli altri vertebrati superiori. Inoltre lo studio biologico comparato delle malattie tumorali nelle varie specie animali, inclusi i pesci, costituisce un importante mezzo per la comprensione delle cause, dell'epidemiologia e del comportamento biologico delle neoplasie umane.

A differenza della maggior parte delle altre patologie riscontrabili nei pesci, l'interesse nello studio delle neoplasie non nasce dal desiderio di conoscenza di dati quali incidenza e danno economico, in quanto detti valori risultano sempre limitati e insignificanti, bensì dal fatto che i pesci, prevalentemente quelli stanziali, possono essere considerati importantissimi *biomarkers*, utili per valutare lo stato delle acque e spesso risultano eccezionali modelli sperimentali, attendibili, economici e di facile gestione.

L'eziologia delle neoplasie dei pesci è in linea generale molto complessa e rimangono ancora ignoti alcuni fattori che contribuiscono all'iniziazione e alla crescita della neoplasia. Molti fattori sono infatti collegati alla loro possibile comparsa; tra i più rilevanti troviamo l'età, mentre, in alcuni casi, è il sesso dei pesci a influire sull'incidenza della malattia. Certo è, invece, il ruolo svolto dalla temperatura essendo, per la maggior parte dei pesci, la stessa dell'acqua circostante; le basse temperature generalmente riducono l'incidenza delle neoplasie nei pesci esposti ai cancerogeni chimici. La predisposizione genetica è un fattore ben noto in oncologia, vista la tendenza di certe specie a sviluppare particolari tipi di neoplasie; dettagliati studi infatti sono stati condotti sul melanoma degli ibridi di *Xiphophorus*. Sono inoltre state dimostrate strette relazioni tra la genetica e la suscettibilità a neoplasie indotte dalle radiazioni. Ma le ipotesi più suggestive riguardano i più recenti studi sulle associazioni virali con le neoplasie studiate attraverso l'isolamento in colture cellulari, la trasmissione sperimentale e il microscopio elettronico per la ricerca di particelle virali da ricollegare all'eziologia tumorale. Infine, molti fattori chimici considerati cancerogeni nei mammiferi sono stati riconosciuti come causa di neoplasia nei pesci e molti aspetti dei cancerogeni chimici sono stati valutati da diversi autori, considerando varie sostanze che sono state chiaramente associate con le neoplasie dei pesci selvatici o allevati, o che sono state usate ampiamente negli esperimenti in laboratorio. Interessanti, infatti, appaiono le differenti induzioni di queste sostanze estranee, essendo stati rilevati sia un effetto promotore da parte di queste sostanze sia, sorprendentemente, effetti inibitori. Essenziale è il ruolo di "promoters" assunto da determinati cancerogeni che vengono considerati anche degli attivatori di virus oncogeni.

Concludendo, possiamo con sicurezza affermare che siano proprio i virus oncogeni e le sostanze tossiche cancerogene le cause più comuni di neoplasia dei pesci.

Come accennato, numerose sono le analogie tra i tumori dei pesci ossei e quelli dei vertebrati superiori, per quanto riguarda i fattori causali e i meccanismi di crescita, così come negli aspetti strutturali, anche se generalmente nei pesci le valutazioni prognostiche hanno significato diverso.

Classici effetti dei tumori includono impedimenti meccanici alla locomozione, interferenze con la colorazione protettiva e incremento della suscettibilità alla predazione.

I ricercatori traggono numerosi vantaggi nell'usare i pesci per finalità sperimentali in termini di spazio, tempo e costo. Ciò è particolarmente vero per i piccoli pesci d'acquario, che risultano facili da allevare in condizioni di laboratorio. É noto che il successo di zebrafish è legato sia alla sua resistenza e tolleranza a un ampio range di condizioni ambientali, sia ad altri aspetti chiave, tra cui le ridotte dimensioni, l'elevata fecondità che porta alla produzione di un elevato numero di uova prodotte, lo sviluppo all'esterno degli embrioni che sono trasparenti, e la rapida crescita (Lawrence, 2007). Per tale motivo, i ricercatori possono facilmente produrre e mantenere un gran numero di adulti, giovanili, larve ed embrioni a costo contenuto per numerose procedure sperimentali.

I tumori che si sviluppano in zebrafish presentano forte similarità, dal punto di vista morfologico, istologico, fisiologico e molecolare, con quelli umani (Stern e Zon, 2003), inoltre i processi di carcinogenesi in uomo e zebrafish sono molto simili (Lam *et al*., 2006).

I ricercatori attualmente possono utilizzare due differenti approcci per sviluppare modelli di neoplasia in zebrafish: il modello di neoplasia di tipo genetico e il modello di neoplasia ottenuto grazie a trapianto. In seguito al primo esperimento condotto, sono state trapiantate cellule di melanoma maligno umano in zebrafish e si è scoperto che esse non solo non venivano rigettate, ma addirittura sopravvivevano e si diffondevano rapidamente nel suo organismo (Lee *et al*., 2005; Topczewska *et al*., 2006). Le principali linee cellulari tumorali umane finora trapiantate con successo in embrioni di zebrafish sono state melanomi (Haldi *et al*., 2006; Smith *et al*., 2013; Chapman *et al*., 2014), tumori del colon retto (Haldi *et al*., 2006), tumori della mammella (Harfouche *et al*., 2009; He *et al*., 2012), leucemie (Corkery *et al*., 2011), tumori delle ovaie (Latifi *et al*., 2011), neuroblastomi (Zhao *et al*., 2009), tumori del pancreas (Marques *et al*., 2009; Weiss *et al*., 2009), tumori della prostata (Ghotra *et al*., 2012) e sarcomi (Veinotte *et al*., 2014).

Vari esperimenti sono stati condotti su zebrafish transgenici per analizzare meglio l'eterogeneità delle cellule tumorali e comprendere i processi che portano allo sviluppo di resistenza clonale verso i medicinali (Blackburn e Langenau, 2014).

Nondimeno, numerose altre specie ittiche forniscono validi modelli sperimentali. Ad esempio, il medaka (*Oryzias latipes*) è considerato un valido modello del retinoblastoma umano, nonché l'unica specie di vertebrato in cui questo tumore è inducibile chimicamente (Ostrander, 2000). Inoltre, sono da ricordare i modelli di neurofibromatosi umana individuati nel damselfish (*Pomacentrus partitus*) e nel pesce rosso (*Carassius auratus*) (Mc Kinney e Schmale 1994) e gli ibridi del genere Xiphophorus che sono stati studiati come modelli di melanoma maligno (Setlow *et al*., 1989; Setlow 1996).

Bibliografia

- Blackburn J.S., Langenau D.M., 2014. Zebrafish as a model to assess cancer heterogeneity, progression and relapse. Disease Models and Mechanisms 7 pp. 755-762.
- Chapman A., Fernandez A., Ferguson J., Kamarashev J., Wellbrock C., Hurlstone A., 2014. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. Cell Reports 8 pp. 688–695.
- Corkery D.P., Dellaire G., Berman J.N., 2011. Leukaemia xenotransplantation in zebrafish–chemotherapy response assay in vivo. British Journal of Haematology 153 pp. 786–789.
- Ghotra V.P., He S., de Bont H., van der Ent W., Spaink H.P., van de Water B., Snaar-Jagalska B.E., Danen E.H., 2012. Automated whole animal bio-imaging assay for human cancer dissemination. PLoS One 7(2) e31281.
- Haldi M., Ton C., Seng W.L., McGrath P., 2006 Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. Angiogenesis 9 pp. 139–151.
- Harfouche R., Basu S., Soni S., Hentschel D.M., Mashelkar R.A., Sengupta S., 2009. Nanoparticle- mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signalling inhibits angiogenesis. Angiogenesis 12 pp. 325–338.
- He S., Lamers G.E., Beenakker J.W., Cui C., Ghotra V.P., Danen E.H., Meijer A.H., Spaink H.P., Snaar-Jagalska B.E., 2012. Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. Journal of Pathology 227 pp. 431–445.
- Lam S.H., Wu Y.L., Vega V.B., Miller L.D., Spitsbergen J., Tong Y., Zhan H., Govindarajan K.R., Lee S., Mathavan S., Krishna Murthy K.R., Buhler D.R., Liu E.T., Gong Z., 2006. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. Nature Biotechnology 24 pp. 73-75
- Latifi A, Abubaker K, Castrechini N, Ward AC, Liongue C, Dobill F., Kumar J., Thompson E.W., Quinn M.A., Findlay J.K., Ahmed N., 2011. Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. Journal of Cell Biochemistry 112 pp. 2850–2864.
- Lawrence C., 2007. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture 269 pp. 1-20.
- Lee Lisa M.J., Seftor E.A., Bonde G., Cornell R.A., Hendrix M.J.C., 2005. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. Developmental Dynamics 233 pp. 1560-1570.
- Marques I.J., Weiss F.U., Vlecken D., Nitsche C., Bakkers J., Lagendijk A. K., Partecke L.I., Heidecke D., Lerch M.M., Bagowski C.P., 2009. Metastatic behaviour of primary human tumors in zebrafish xenotransplantation model. BMC Cancer 9 pp. 128-140.
- McKinney E.C., Schmale M.C., 1994. Damselfish with neurofibromatosis exhibit cytotoxicity toward tumor targets. Developmental and Comparative Immunology 18 pp. 305-313.
- Ostrander, Gary Kent. The Laboratory Fish. San Diego: Academic Press, 2000.
- Setlow, B. and Setlow, P. (1996) Role of DNA repair in Bacillus subtilis spore resistance. Journal of Bacteriology 178, 3486±3495.
- Setlow, R. B., A. D. Woodhead and E. Grist (1989) Animal model for ultraviolet radiation-induced melanoma: platyfish swordtail hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8922-8926.
- Smith M.P., Ferguson J., Arozarena I., Hayward R., Marais R., Chapman A., Hurlstone A., Wellbrock C., 2013. Effect of SMURF2 targeting on susceptibility to MEK inhibitors in melanoma. Journal of the National Cancer Institute 105 pp. 33–46.

– Stern H.M., Zon L.I., 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. Nature Reviews Cancer 3 pp. 1-7.
– Topczewska J.M., Postovit L.M., Margaryan N.V., Sam A., Hess A.R., Wheaton W.W., Nickoloff B.J., Topczewski J., Hendrix M.J.C., 2006. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. Nature Medicine 12(8) pp. 925-932.
– Veinotte C.J., Dellaire G., Berman J.N., 2014. Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. Disease Models and Mechanisms 7 pp. 745–754.
– Weiss F.U., Marques I.J., Woltering J.M., Vlecken D.H., Aghdassi A., Partecke L.I., 2009. Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer. Gastroenterology 137 pp. 2136–2145.
– Zhao H., Tang C., Cui K., Ang B.T., Wong S.T., 2009. A screening platform for glioma growth and invasion using bioluminescence imaging. Laboratory investigation. Journal of Neurosurgery 111 pp. 238–246.

I TUMORI DEI NERVI PERIFERICI DEI PESCI QUALI MODELLO DI STUDIO IN ONCOLOGIA COMPARATA

FABIO MARINO[1], GIOVANNI LANTERI[2], BATTESIMO MACRÌ[2]

[1] Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; [2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina

I Tumori delle Guaine dei Nervi Periferici (PNSTs)

I Tumori delle Guaine dei Nervi Periferici (Peripheral Nerve Sheath Tumours o PNSTs) sono neoplasie dei nervi periferici riportate in quasi tutti i vertebrati. Questi tumori mostrano sia forme benigne (BPNSTs) sia maligne (MPNSTs). Lo schwannoma (neurilemmoma) e il neurofibroma sono disordini neoplastici appartenenti ai PNST e sono stati classificati in funzione della loro origine cellulare: lo schwannoma origina dalle cellule di Schwann (Sonig *et al*., 2014), mentre il neurofibroma è caratterizzato da una componente mista che include neuriti, cellule di Schwann, fibroblasti e cellule del perinervio (Erlandson 1985; Wippold *et al*., 2007). Lo schwannoma è il tipo di neoplasia più frequentemente descritta nel carassio (*Carassius auratus*) (Picci, 1933; Schlumberger, 1952 e 1957; Mawdesley-Thomas, 1972), ma è stato descritto anche in altri teleostei, quali *Lutjanidae* (Lucké, 1942), *Oncorhynchus kisutch* (Masahito *et al*., 1985), *Pomacentrus partitus* (Schmale *et al*., 2002), *Sparus aurata* (Marino *et al*., 2008), così come in *Osmerus mordax* (Morrison *et al*., 1993) e *Danio rerio* (Marino *et al*., 2012). Generalmente questi tumori risultavano benigni, ma Finkelstein & Danchenko-Ryzchkova (1965) and Sirri et al. (2015) hanno riportato due singoli casi di schwannoma maligno rispettivamente in *Perca fluviatilis* e *C. auratus*. L'elevata incidenza e la peculiare distribuzione in alcune popolazioni ittiche ha suggerito una possibile eziologia virale, recentemente confermata solo nel damselfish (Schmale *et al*., 2002). Il neurofibroma è stato riportato in *Lumpenus sagitta* (McArn e Wellings, 1967), *C. auratus* (Duncan e Harkin, 1968), *Gadus macrocephalus* (Wellings, 1969) e cefalo (*Mugil cephalus*) (Marino *et al*., 2010). Un caso particolare di BPNST è il mixoma delle guaine dei nervi dermici descritto nel salmone (Honma, 1965) e nell'anguilla (Gjurcevic *et al*., 2014). Talvolta, trattandosi di tumori a cellule fusate, può risultare molto difficile distinguere lo schwannoma e il neurofibroma e, in particolare, differenziarli entrambi dal fibroma (Scarpelli, 1969). In considerazione della difficoltà nell'identificazione degli aspetti istologici caratterizzanti lo schwannoma e il neurofibroma, alcuni autori hanno preferito in passato considerarli come una singola entità morfologica (Scarpelli, 1969; Cordy, 1990; Jubb e Huxtable, 1993). Le caratteristiche ultrastrutturali, quali la presenza di estesi processi citoplasmatici e membrane basali (Duncan e Harkin, 1969), e più recentemente l'immunoistochimica (Marino *et al*., 2007) sono state proposte per differenziare gli schwannomi dai neurofibromi nei Teleostei.

Case reports

Nel ventennio 1996/2016, numerose segnalazioni di neoplasie spontanee dei teleostei sono state documentate e registrate presso l'Unità di Patologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina e in alcuni casi si trattava di soggetti stabulati presso il Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS), Stabilimento Utilizzatore autorizzato per la sperimentazione su pesci.

Un esemplare adulto di zebrafish (*D. rerio*), nato e allevato in una batteria sperimentale presso il CISS, presentava numerose neoformazioni di colore nerastro su diverse porzioni del corpo. Il soggetto era stato stabulato per un anno e aveva mostrato la comparsa delle prime lesioni circa tre mesi prima dell'eutanasia. Il pesce è stato soppresso mediate immersione prolungata in MS-222 alla concentrazione di 0,7 mg/l. E' stata effettuata un'autopsia con l'ausilio di uno stereo microscopio, che ha anche permesso un'agevole documentazione iconografica.

Sedici esemplari di carassio (*C. auratus*), presentanti diversi tumori esofitici su varie porzioni del corpo, sono stati inviati nel corso di un decennio per un'indagine anatomo-istopatologica. I pesci provenivano da siti diversi variamente distribuiti nel territorio regionale e avevano un'età variabile tra 3 e 12 anni.

Un maschio adulto di cefalo (*M. cephalus*), con una massa singola esterna, è stato inviato per indagini istopatologiche. La testa era stata fissata *in toto* in soluzione tamponata di formalina per 24 ore e quindi routinariamente processata per l'inclusione in paraffina.

Un esemplare adulto di orata (*S. aurata*), mostrante una neoformazione singola sul dorso, è stato inviato per approfondimenti diagnostici. I campioni sono stati routinariamente processati per l'istopatologia, istochimica e immunoistochimica.

Otto esemplari giovanili di anguilla Europea (*A. anguilla*), venivano campionati da un impianto commerciale in Croazia. Tutte le anguille presentavano noduli esofitici su differenti parti del corpo. I soggetti sembravano apparentemente sani e mostravano buone condizioni corporee. Dopo eutanasia con MS-222 a dose letale, si effettuavano le autopsie con l'ausilio di uno stereoscopio.

I campioni prelevati all'atto delle autopsie sono stai processati routinariamente per l'istopatologia, l'istochimica e l'immunoistochimica. Per la colorazione immunoistochimica, gli anticorpi utilizzati sono stati S-100, GFAPR40 e calretinina.

Risultati

Le neoformazioni (0,05/3 x 0,02/1 mm) dello zebrafish erano presenti su differenti porzioni corporee e apparivano come noduli molli, lisci, di colore scuro, nero o grigio scuro. Un nodulo di dimensioni maggiori era apprezzabile a livello della porzione estrema della mandibola (fig. 1). All'esame macroscopico il tessuto neoplastico appariva omogeneo, pallido o grigiastro. In prossimità della lesione venivano riscontrati altri tre piccoli noduli in prossimità della linea laterale dello stesso soggetto (fig. 2). Istologicamente il tumore presentava margini ben distinti ed era adeso ai tessuti sottostanti; il tessuto neoplastico era prevalentemente costituito da cellule allungate con nuclei ellissoidi, ipercromatici e citoplasma pallido. Queste cellule fusate, soprattutto a livello periferico, risultavano densamente stipate e disposte in fasci paralleli con caratteristiche istologiche simili al tessuto di Antoni tipo A (fig. 3). In altri distretti del tumore le cellule tumorali risultavano immerse in una matrice stromale lassa mixomatosa compatibile con il tessuto di Antoni tipo B. Sempre a livello microscopico al di sotto dell'epidermide erano presenti abbondanti melanofori che conferivano una colorazione scura al tumore (fig. 4). Le sezioni istologiche colorate con tricromica di Masson hanno invece dimostrato la carenza di collagene (fig. 5) mentre la colorazione immunoistochimica ha mostrato una forte positività nelle cellule neoplastiche per la proteina S-100, per la calretinina e per la GFAP (fig. 6).

Tutti i carassi studiati presentavano a livello caudale neoformazioni esofitiche riconducibili a shwannomi di dimensioni variabili, a insorgenza multicentrica e con caratteristiche macroscopiche sovrapponibili (fig. 7). Queste lesioni (di dimensioni 0,3/1 x 0,5/1 cm) apparivano come neoformazioni nodulari sottocutanee lisce e di consistenza molle; al taglio apparivano macroscopicamente omogenee, di colorazione pallida fino a lievemente rosata. In nessun

Fig. 1. *Danio rerio*: schwannoma. Tessuto neoformato di aspetto tondeggiante e nerastro localizzato a livello della porzione estrema della mandibola

Fig. 2. *Danio rerio*: schwannoma. Particolare di due lesioni neoplastiche di colorito nerastro disposte in prossimità della linea laterale

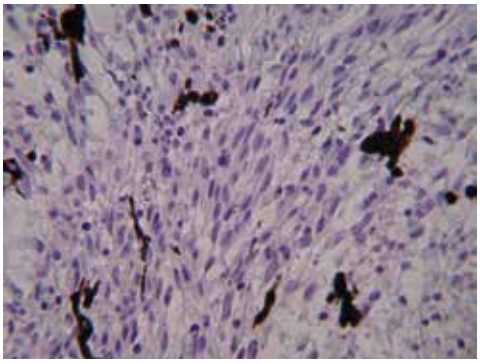


Fig. 3. *Danio rerio*: schwannoma. Preparato istologico in cui sono visibili cellule fusate organizzate a palizzate, caratteristiche del tessuto di Antoni tipo A. (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 40x)

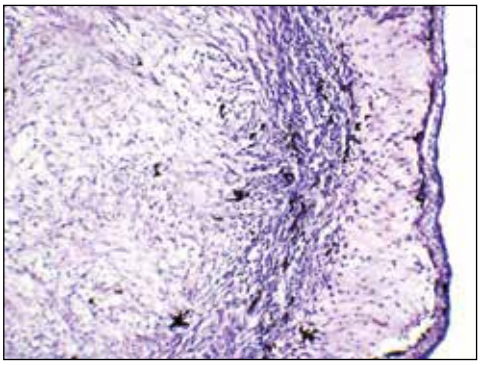


Fig. 4. *Danio rerio*: schwannoma. Preparato istologico di in cui sono visibili a livello delle porzioni periferiche del tumore numerosi melanofori sia in sede dermica sia nell'ambito del tessuto tumorale (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 20x)

pesce si documentava la tendenza della neoplasia ad accrescersi verso i tessuti profondi, né tantomeno si riscontravano metastasi agli organi celomatici. Istologicamente, tali schwannomi mostravano margini ben definiti e apparivano finemente capsulati e costituiti da cellule fusate, con nuclei ellittici e ipercromatici e un citoplasma pallido (fig. 8). Microscopicamente le cellule apparivano addensate e orientate a formare dei fasci paralleli, con i nuclei organizzati a palizzate, che ricordavano il tessuto di Antoni tipo A. In alcune aree del tumore si repertavano inoltre fibre intercellulari formanti fasci intersecanti o vortici. Altre zone del tessuto neoplastico apparivano lasse e scarsamente cellulari, con poche cellule fusiformi immerse in una matrice mixomatosa, compatibile con il tessuto di Antoni tipo B. La tricromica

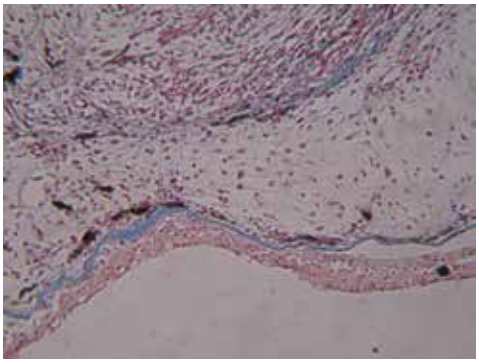


Fig. 5. *Danio rerio*: schwannoma. Preparato istologico in cui il tumore mostra scarsa presenza di connettivo. (colorazione tricromica di Masson; ingr. 20x)

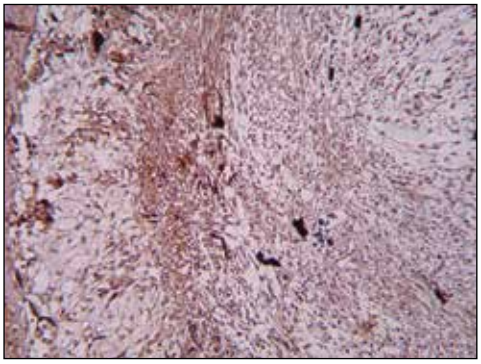


Fig. 6. *Danio rerio*: schwannoma. Notare la positività a livello delle cellule neoplastiche (colorazione immunoistochimica con anticorpo anti-GFAP; ingr. 40x)

Fig. 7. *Carassius auratus*: schwannoma localizzato alla coda

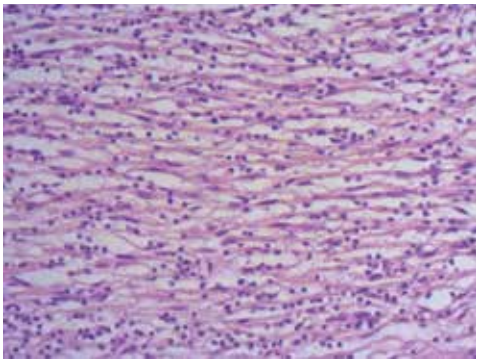


Fig. 8. *Carassius auratus*: schwannoma. Preparato istologico caratterizzato da cellule fusate e nucleo ovoide organizzate in fasci paralleli (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 40x)

di Masson ha rivelato una generale assenza di collagene. La colorazione immunoistochimica ha mostrato una forte positività delle cellule neoplastiche per gli anticorpi anti S 100 e calretinina, con patterns identici in tutti i pesci.

Nel cefalo, il tumore (cm 1x1,5x0,5 cm) era localizzato sul lato destro della testa (fig. 9) e appariva come una massa nodulare appiattita, liscia e soda di consistenza, con una superficie di sezione omogenea, asciutta e biancastra. All'osservazione microscopica (colorazione Ematossilina-Eosina) il tumore risultava originare dal tessuto sottocutaneo della testa, invadeva parzialmente il muscolo e protrudeva verso la pelle con caratteristiche del neurofibroma. Il tessuto neoplastico mostrava limiti ben definiti ed era incapsulato; esso era prevalentemente costituito da cellule allungate, con nuclei ipercromatici, ellissoidi e citoplasma pallido. Le cellule erano disposte in maniera irregolare: nel contesto della proliferazione neoplastica,

Fig. 9. *Mugil cephalus*: neurofibroma localizzato a livello del tessuto sottocutaneo in prossimità della testa

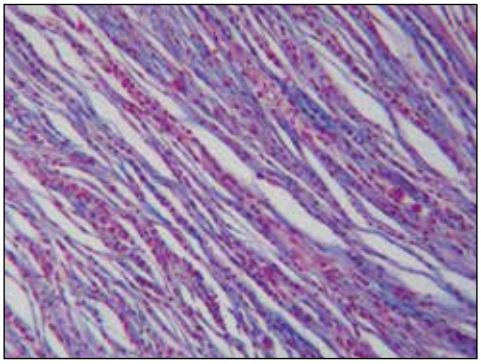


Fig. 10. *Mugil cephalus*: neurofibroma. Preparato istologico in cui è evidente la presenza di tessuto connettivo nella lesione neoplastica (colorazione tricromica di Masson; ingr. 20x)

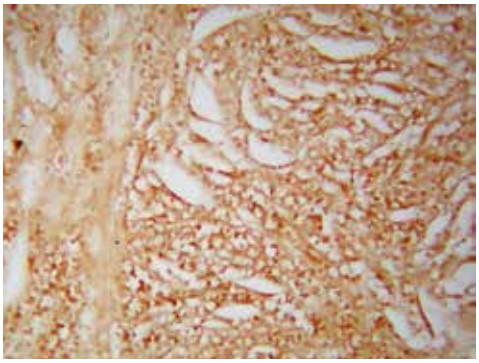


Fig. 11. *Mugil cephalus*: neurofibroma. Notare la positività a livello delle cellule tumorali (colorazione immunoistochimica con anticorpo anti-S-100; ingr. 20x)

Fig. 12. *Sparus aurata*: schwannoma localizzato a livello della regione dorso laterale del corpo.

queste cellule erano fittamente assiepate e talvolta arrangiate in fasci paralleli senza un'organizzazione a palizzate. Nel neurofibroma erano presenti aree del tumore organizzate in fasci intrecciati o vortici con presenza di collagene, e risultavano positive alla colorazione tricromica di Masson (fig. 10). Le stesse sezioni risultavano inoltre positive alla colorazione immunoistochimca con anticorpi contro la proteina S-100 e la vimentina (fig. 11), mentre tutte le sezioni risultavano negative alla calretinina.

Nell'orata, lo schwannoma (6x6x6 cm) appariva come una massa sottocutanea di aspetto nodulare, liscia e soda (fig. 12), con una superficie di sezione omogenea, di colorito da grigio chiaro a leggermente rosato. La neoformazione mostrava limiti ben definiti e originava dorso-lateralmente dal sottocute deformando il lato sinistro della superficie corporea. La pelle sopra il tumore risultava ulcerata. Nelle sezioni istologiche, il tumore si mostrava ben

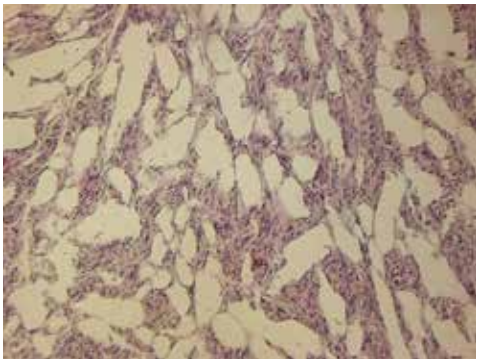


Fig. 13. *Sparus aurata:* schwannoma. Preparato istologico in cui risulta evidente la presenza di cellule organizzate a palizzate, tipico del tessuto di Antoni tipo A frammiste a cellule adipose (colorazione Ematossilina-Eosina; 10x)

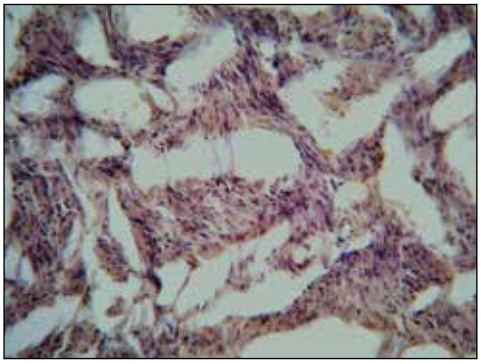


Fig. 14. *Sparus aurata*: schwannoma. Diffusa positività nel tessuto tumorale (colorazione immunoistochimica con anticorpo anticalretinina; ingr. 20x)

Fig. 15. *Anguilla anguilla*: mixoma delle guaine dei nervi dermici. Aspetto macroscopico dei mixomi disposti in serie lungo la linea laterale.

Fig. 16. *Anguilla anguilla*: Preparato istologico di mixoma delle guaine localizzato a livello del derma (colorazione Ematossilina-Eosina; ingr. 10x)

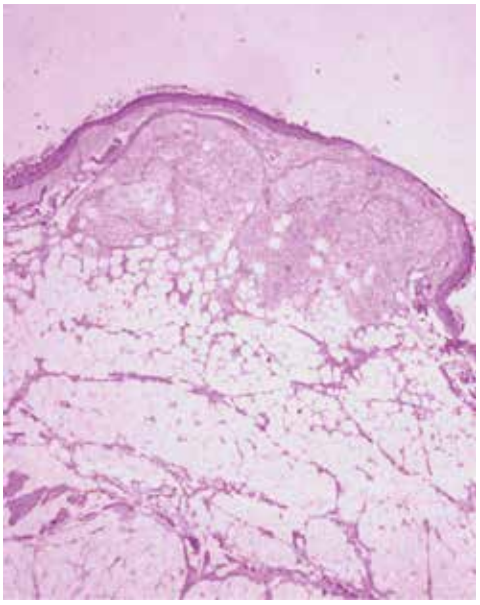


Fig. 16

delimitato e appariva leggermente capsulato. La neoplasia era organizzata in fasci di tessuto irregolarmente disposti tra i quali si repertava costantemente un notevole quantitativo di cellule adipose (fig. 13). Il tessuto tumorale era prevalentemente composto da cellule allungate, con nuclei ellissoidi, ipercromatici e citoplasma pallido. Nel contesto dei fasci di tessuto neoplastico, mostranti un alto grado di cellularità, queste cellule erano solitamente densamente disposte a formare dei fasci paralleli formanti le caratteristiche palizzate di nuclei, che ricordano il tessuto di Antoni tipo A. Non è stato riscontrato alcun tessuto riferibile all'Antoni tipo B. Le sezioni istologiche colorate con tricromica di Masson rivelavano una generale assenza di collagene. La colorazione immunoistochimica mostrava una forte positività nelle cellule neoplastiche testate con gli anticorpi anti- S-100 e calretinina (fig. 14). L'immunoreazione per la calretinina era omogeneamente presente nelle aree di tessuto neoplastico, mentre nessuna reazione si coglieva nel derma.

Dalle analisi eseguite sulle anguille (*Spaurus aurata*) sono state riscontrate lesioni riconducibili a mixoma delle guaine. Macroscopicamente il tessuto neoformato appariva sotto forma di noduli cutanei lisci e di consistenza molle, di 0,8/3,2x0,2/2,3 mm, con pronunciate modificazioni di colore. I noduli erano cupoliformi, con sommità ulcerate ed erano presenti in differenti zone corporee. In generale, i noduli si osservavano in serie lungo la linea laterale su entrambi i lati del corpo, così come lungo i canali sensoriali della testa (fig. 15). La superficie di sezione mostrava un aspetto omogeneo, grigio pallido. Istologicamente, il tessuto neoplastico era localizzato nel derma, occasionalmente invadente l'ipoderma, comprimendo i tessuti sottostanti, senza un'evidente delimitazione. In alcune aree, l'epidermide era costituita da un solo strato di cellule e le goblet cells erano completamente scomparse.. Il tessuto neoplastico appariva mixoide, con rari adipociti e scarse fibre collagene. Le aree mixoidi mostravano forte metacromasia e alcianofilia della sostanza mucoide di fondo. Lo stroma lasso conteneva cellule voluminose, stellate, reticolari, PAS positive, con voluminosi nuclei pallidi ovali (fig. 16). La colorazione immunoistochimica con gli anticorpi anti S-100 e GFAP mostrava leggera reazione positiva nelle cellule neoplastiche dendritiche. La calretinina dava esito negativo.

Discussione

Dalle indagini macroscopiche, microscopiche, istochimiche e immunoistochimiche possiamo affermare che i tumori ai nervi periferici nei teleostei sono principalmente rappresentati dal neurofibroma nel cefalo, dallo schwannoma nel carassio, nello zebrafish e nell'orata, e dal mixoma delle guaine nei nervi periferici nelle anguille.

Per quanto concerne gli aspetti in oncologia comparata, è stato sostenuto che ci possa essere un'analogia tra i PNST trovati nel carassio e la neurofibromatosi di Von Recklinghausen degli uomini (Schlumberger, 1952; Schmale *et al*., 1983), mentre risultano differenti i PNST descritti nel cefalo e nell'orata rispetto alla controparte umana. Per quanto riguarda invece lo schwnnoma, l'aspetto macroscopico e i reperti istologici presentati nei carassi non differiscono dai quadri caratterizzanti lo schwannoma in *C. carpio* e gli schwannomi dell'uomo e degli animali domestici. Gli aspetti istologici dei tumori descritti, quali la presenza di tessuto di Antoni tipo A e B, così come la presenza di reminescenze di fibre nervose solo alla periferia del tumore, supportano un'origine cellulare del tumore dalle cellule di Schwann. L'origine della neoplasia è comunque confermata dalla colorazione positiva delle cellule neoplastiche con la calretinina nel neurofibroma del cefalo. L'origine inoltre viene confermata dalle caratteristiche istologiche precedentemente illustrate e dall'assenza del tessuto di Antoni tipo A e B, così come dalla presenza di reminescenze di fibre nervose disperse nelle porzioni più interne del tumore e dalla positività delle cellule neoplastiche all'S-100 e alla vimentina, così come dalla negatività della reazione per la calretinina. In *aurata* i reperti istologici del-

lo schwannoma invece differiscono notevolmente da quelli del carassio e degli schwannomi dell'uomo e degli animali domestici. Gli aspetti istologici che contraddistinguono il nostro reperto sono la presenza di grasso tra le cellule neoplastiche, la presenza di tessuto di Antoni tipo A e l'assenza di tessuto di Antoni tipo B, che non hanno permesso di identificare agevolmente l'istogenesi di questo tumore. L'origine della neoplasia è supportata solamente dalla colorazione positiva delle cellule neoplastiche con la calretinina, uno specifico marker usato per distinguere le varianti morfologiche dei PNST dell'uomo (Fine *et al*., 2004) e del carassio (Marino *et al*., 2007).

Riassumendo, i dati riportati confermano il ruolo dell'immunoistochimica per la calretinina, quale metodo diagnostico utile per distinguere lo schwannoma dal neurofibroma nell'uomo (Fine *et al*., 2004) e anche nei pesci. L'espressione della proteina S-100, anch'essa ampiamente dimostrata nei pesci (Germanà *et al*., 2007) è comunque sempre di supporto per l'identificazione di tumori del sistema nervoso anche se non permette l'identificazione dei sottotipi di PNSTs.

La localizzazione del neurofibroma alla testa del cefalo, dello schwannoma dello zebrafish, così come dei mixomi lungo la linea laterale delle anguille, potrebbe essere messa in relazione con la presenza, in queste regioni, di una ricca rete di strutture nervose.

Il significato di questo studio è anche di sostenere il carassio quale modello sperimentale per lo studio dei tumori delle guaine nervose dei vertebrate superiori. Di contro, i dati su esposti permettono di proporre i PNSTs dell'orata e del cefalo quali modelli per lo studio delle varianti morfologiche inusuali delle analoghe neoplasie dei vertebrati superiori.

Lo zebrafish è un modello animale ampiamente diffuso e utilizzato nello studio di diversi processi patologici dei vertebrati superiori, inclusi i tumori degli esseri umani. Negli ultimi anni, sono state isolate alcune linee di zebrafish mutanti per i geni MMR mlh1, msh2, e msh6, e i mutanti omozigoti di tutte e tre le linee sviluppano neurofibromi/MPNST. Recentemente, il ruolo delle mutazioni dei geni NF2 e p53 nella tumorigenesi è stato enfatizzato dall'osservazione dell'insorgenza di MPNST in zebrafish mutanti per NF2 e p53. Le linee di zebrafish deficienti di tp53, dopo 8,5 mesi di età, sviluppano spontaneamente MPNSTs, che di contro risultano rarissimi nei soggetti wild-type e indicano un ruolo quale tumor suppressor di *tp53* in zebrafish. La disponibilità di linee di zebrafish che sviluppano tali PNSTs potrebbe costituire un valido aiuto alla ricerca in campo biomedico per meglio comprendere anche l'eziopatogenesi di tali neoplasie nei vertebrati superiori.

La possibile causa del tumore rimane comunque non del tutto chiara. Diversi studi sembrano attribuire la causa dei PNSTs nei pesci a cause genetiche, sebbene siano stati suggeriti anche tossine (Gardner e Yevich 1988) e virus (Schmale *et al*., 2002). Più recentemente, come già accennato, numerose evidenze suggerirebbero una predisposizione genetica all'insorgenza del tumore nello zebrafish. Nondimeno, è stata studiata una linea mutante di zebrafish sensibile alla temperatura, che offre un interessante modello di vertebrato per il sistema *tp53*-inducibile che può essere regolato *in vivo*, semplicemente controllando la temperatura dell'acqua (Berghmans *et al*., 2005). Questi zebrafish modelli per *tp53* forniscono nuovi spunti per comprendere i meccanismi che sopprimono la tumorigenesi nei vertebrati e che possono anche servire come modelli per gli screenings genetici.

Il mixoma dei nervi dermici descritto in anguilla può essere diagnosticato sulla base della sola istopatologia, con l'ausilio della PAS reazione a pH 2,5, poiché il tessuto lasso non fornisce risultati chiari alla colorazione immunoistochimica per la scarsità di cellule. I reperti istopatologici dei casi sopra descritti, come la presenza di cellule stellate, PAS-positive, giacenti in una matrice mucoide, alcianofila e metacromatica, sono consistenti con una diagnosi di mixoma (Pulley e Stannard, 1990; Manera e Biavati, 1995). I tumori qui descritti ricordano quelli riportati nel carangide *Seriola lalandi* (Keller *et al*., 2011), così come i casi descritti nei vertebrati superiori. L'identificazione dell'origine cellulare è stata comunque supportata anche dalla positività nei confronti di S-100 e GFAP, sebbene come già detto di non facile rilievo.

Conclusioni

L'identificazione dell'origine specifica di un PNST si basa quindi sull'espressione o meno delle calretinina, in associazione a quella della proteina S-100 o di altri markers neuronali. L'espressione della calretinina nelle cellule di Schwann è strettamente correlata a quella dei neuroni con cui le cellule di Schwann interagiscono, e pertanto gli schwannomi e i neurofibromi potrebbero originare rispettivamente sia da cellule di Schwann positive (circa il 95%) sia negative alla calretinina (Fine *et al*., 2004). La differenza nell'immunoreazione della calretinina potrebbe essere il risultato di differenti pathways patogenetici associati con schwannomi e neurofibromi. I neurofibromi sono tipicamente associati ad anomalie del gene NF1, mentre gli schwannomi sono associati con anomalie genetiche dell'NF2.

In conclusione, risulta chiaro che i PNSTs dei teleostei, sia da un punto di vista morfologico sia immunoistochimico sia genetico, sono un modello sperimentale utile per studiare le corrispondenti neoplasie dei vertebrati superiori. Si evince inoltre il ruolo fondamentale dell'immunoistochimica per l'identificazione delle varianti di PNSTs, nonché delle varianti atipiche di schwannoma, come quelli documentati nell'orata, con una forte componente adiposa, o nello zebrafish, in cui il tessuto era ricco in melanociti.

Bibliografia

- Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D and others (2005) tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. Proc Natl Acad Sci USA 102: 407–412
- Cordy D.R. (1990) Tumours of the Nervous System and Eye, *Tumors in domestic animals ed. by J. E. Moulton* 14:652-54. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- Duncan T.E. & Harkin J.C. (1968). Ultrastructure of spontaneous goldfish tumors previously classified as neurofibromas. *American Journal of Pathology*. 52, 33a.
- Duncan T.E. & Harkin J.C. (1969). Electron microscopic studies of goldfish tumours previously termed neurofibromas and schwannomas. *American Journal of Pathology*. 55,191-202.
- Erlandson RA (1985) Peripheral nerve sheat tumor. Ultrastruct Pathol 9:113-122
- Fine S.W., McClain S.A., Li M. (2004) Immunohistochemical staining for calretinin is useful for differentiating schwannomas from neurofibromas. *Am. J. Clin. Pathol*. Oct.; 122 (4): 552-9.
- Finkelstein and Danchenko-Ryzchkova (1965). Neurinoma in the perch, *Perca fluviatilis*. Arch. Patol. 27: 81-84.
- Gardner R, Yevich PP (1988) Comparative histopathological effects of chemically contaminated sediment on marine organisms. 4th Int Symp on responses of marine organisms to pollutants, April 1987, Woods Hole, MA. Mar Environ Res 24: 311–316
- Germanà A., Marino F., Guerrera M.C., Campo S., de Girolamo P., Montalbano G., Germanà G.P., Ochoa-Erena F.J., Ciriaco E., Vega J.A. (2007) Expression and distribution of S100 protein in the nervous system of the adult zebrafish (*Danio rerio*). *Microsc Res Tech* 71(3):248-255
- Gjurcevic E, Kuzir S, Sfacteria A, Drasner K, Marino F (2014) Spontaneous multicentric myxoma of the dermal nerve sheaths in farmed European eels *A. anguilla*. Dis Aquat Org 111(2):173-176
- Honma DJY (1965) A case of the myxoma developed in the head of the salmonoid fish, the ayu *Pleeoglossus altivelis* Texnminck et Schlegel. Bull Jpn Soc Sci Fish 31: 192–197
- Jubb KVF, Huxtable CR (1993) Neoplastic diseases of the nervous system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (eds) Pathology of domestic animals, 4th edn. Academic Press, London, p 437–439
- Keller M, Han S, Snekvik K (2011) Severe anisakiasis and cutaneous myxoma in a California yellowtail, *Seriola lalandi* Valenciennes. J Fish Dis 34: 635–639
- Levanti M.B., Montalbano G., Laurà R., Ciriaco E., Cobo T., García-Suarez O., Germanà A., Vega JA. (2008) Calretinin in the peripheral nervous system of the adult zebrafish. *J Anat*. 212(1):67-71.
- Lucké B. (1942). Tumours of the nerve sheats in fish of the snapper family (Lutianidae) *Archs. Path.,* 34 :133-150.
- ManeraM, Biavati S (1995) A fibromyxoma in a tench, *Tinca tinca* L. J Fish Dis 18: 627–630
- Marino F., Germanà A., Bambir S., Helgason S., De Vico G., Macrì B. (2006). Calretinin and S-100 expression in goldfish schwannoma. *Journal of Fish Diseases* 30(4):251-3.
- Marino F.; A. Germana'; A. Panebianco (2008) A case of schwannoma in farmed Seabrem *Sparus aurata*. Dis of Aquat Org (Issn:0177-5103), P. 249-252. Vol. 82,
- Marino F., Macrì D., Lanteri G., Manganaro M., Monaco S., Germanà A. (2010) Neurofibroma in a mullet (*Mugil cephalus*). histochemical and immunohistochemical study. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(2): 92-94 22.

- Marino F, Lanteri G, Rapisarda G, Perillo A, Macrì B (2012) Spontaneous schwannoma in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). J Fish Dis 35: 239–242
- Marino F, Licata L, Albano M, Ieni A, Di Caro G, Macrì B (2016) Angioleiomyoma in a conger (*Conger conger*). Dis Aquat Org 119(1): 85-9
- McArn G, Wellings SR (1967) Neurofibroma in a teleost fish *Lumpenus sagitta*. J Fish Res
- Board Can 24:2007–2009
- Masahito P., Ishikawa T., Yanagisawa A., Sugano H., Ikeda K. (1985) Neurogenic tumors in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) reared in well water in Japan. *J Natl Cancer Inst*. 75(4): 779-790.
- Mawdesley-Thomas, L.E. (1972). Diseases of fish. *Academic Press New York 380 p*.
- Neurofibroma in a teleost fish *L. sagitta*. J of the Fisheries Res Board of Canada, 24, 2007–2009.
- Morrison C.M., Harshbarger J.C., McGladdery S.E. (1993). Schwannoma in rainbow smelt. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5: 317-323.
- Picci (1933). Di un non comune tumore di un pesce (Neurinoma). On an uncommon tumour in a fish (Neurinoma). *Sperimentale*, 86:128-130.
- Pulley LT, Stannard AA (1990) Tumors of the skin and soft tissues. In: Moulton JE (eds) Tumors in domestic animals. University of California Press, Berkeley, CA, p 23–87
- Scarpelli D.G. (1969). Comparative aspects of Neoplasia in fish and other laboratory animals. In *Fish in Research: 45-85, Neuhaus, O.W.e Halver, J.E. (Eds). New York and London Academic Press*.
- Schlumberger H.G. (1952) Nerve sheath tumors in an isolated goldfish population. Cancer Research 12, 890–899.
- Schlumberger H.G. (1957) Tumors characteristic for certain animal species. A review. Cancer Research 17, 823–832.
- Schmale M.C., Gibbs P.D.L. & Campbell C.E. (2002) A virus like agent associated with neurofibromatosis in damselfish. Diseases of Aquatic Organisms 49, 107–115.
- Schmale M.C., Henseley G., Udey L.R. (1983) Neurofibromatosis, von Recklinghansen's diseases, multiple schwannomas, malignant schwannomas. Multiple schwannomas in the bicolour damselfish, *Pomacentrus partitus* (Pisces, Pomacentridae) *Am. J. Path*., Aug.112 (2): 238-41.
- Sirri R, Diana A, Scarpa F, Brachelente C, Vitellozzi G, Ceredi L, Mandrioli L (2015) Ultrasonographic and pathologic study of schwannoma in a Goldfish (*C. auratus*). Vet Clin Path 44(4):586-591
- Sonig A, Gandhi V, Nanda A (2014) From the Cell of Schwann to Schwannoma—a Century's Fruition. World Neurosurg 82(5): 906–911
- Wellings SR (1969) Neoplasia and primitive vertebrate phylogeny:echinoderms, prevertebrates, and fishes – a review. Natl Cancer Inst Monogr 31:59–128
- Wippold FJ, Lubner M, Perrin RJ, Lammle M, Perry A (2007) Neuropathology for the
- Neuroradiologist: Antoni A and Antoni B Tissue Patterns. Am J Neuroradiol 28:1633–38

MOLLUSCHI BIVALVI: MODELLI EMERGENTI IN ONCOLOGIA COMPARATA

GIONATA DE VICO, FRANCESCA CARELLA

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II

La letteratura suggerisce che i fenomeni neoplastici sono variamente rappresentati nei differenti gruppi di invertebrati, essendo descritti negli Artropodi (con la classe dei Crostacei), negli Insetti (più di 100 casi), nei Molluschi e negli Cnidari (in particolare nei coralli). Numerosi esempi sono inoltre riportati nel Registry of Tumors in Lower Animals (RTLA) (Sterling, Virginia, USA.), una collezione di più di 7500 campioni (ormai chiusa per mancanza di fondi) comprendente sia vertebrati sia invertebrati acquatici. Fatta eccezione per i pochi casi descritti nei gasteropodi, nei molluschi le neoplasie sono più frequentemente diagnosticate nei bivalvi, in cui vengono riportate in almeno 20 specie, comprendenti diverse famiglie (Ostreidi, Veneridi, Mitilidi e Miodi). Tumori spontanei nei Bivalvi, come il papilloma a livello del mantello e i tumori pericardici, sono descritti per la prima volta nel 1891 (Collinge), unitamente a casi di neoplasie dell'epitelio branchiale, accompagnati ai più comuni tumori gonadici e delle cellule del sistema immunitario, gli emociti (Farley, 1969a/b; Farley, 1976; Yevich e Barszcz 1976; Elston et al., 1988; McGladdery et al., 2001; Darriba et al., 2006; AboElkhair et al., 2009; Carella et al., 2009). Pauleay (1969) è il primo a trattare in modo sistematico i disordini proliferativi in queste specie; in seguito, Sindermann (1990) e Barber (2004) descrivono in modo dettagliato le più comuni forme di tumore nei bivalvi di interesse commerciale, le loro principali caratteristiche e i possibili agenti eziologici.

Due tipi di neoplasia si verificano più diffusamente in queste specie: (1) la c.d. Neoplasia Emocitaria o Neoplasia Diffusa o leucemia, caratterizzata da una anomala proliferazione di cellule atipiche di probabile derivazione emocitaria e dalla complessa eziologia (De Vico e Carella 2015); (2) il Germinoma, una neoplasia gonadica costituita da cellule germinali atipiche (Carella et al., 2009). Per le loro caratteristiche di crescita e cellularità, entrambe soddisfano i criteri dei tumori maligni (Sparks, 1985). La distribuzione e l'incidenza di tali lesioni risultano variabili tra le specie, mostrando una maggiore diffusione nelle aree temperate come il territorio nord-americano, con pochi casi nel Sud-America, nel mare del Nord e nella Scandinavia (Landsberg et al., 1996), e con scarsa documentazione nell'area mediterranea. In generale, le specie che risultano maggiormente colpite da lesioni neoplastiche sono Mya arenaria (mollusco bivalve prevalentemente rappresentato negli Stati Uniti e in Canada), Mytilus trossulus e Cerastoderma edule. Tra gli ostreidi, Ostrea edulis e Ostrea conchaphila sviluppano frequentemente la neoplasia emocitaria, mentre in Crassostrea virginica e Tiostrea chilensis la prevalenza della malattia è più bassa, e in C. gigas risulta scarsamente rappresentata. Numerosi casi di tumori emocitari e gonadici sono stati riportati in C. virginica nella baia di Chesapeake (USA), fra il 1970-80, con incidenza minore negli ultimi decenni.

Casi di mortalità associati a tale patologia sono stati registrati in O. edulis (Alderman, 1977) O. conchaphila (Farley e Sparks, 1970) M. arenaria (78%) nel New England, e M. trossulus, contribuendo talora al declino delle popolazione nell'area (Cooper et al., 1982; Cosson-Mannevy et al., 1984; Farley et al., 1986; Leavitt et al., 1990; Brousseau e Baglivo, 1991). Casi di neoplasie prevalentemente epiteliali sono stati inoltre registrati in molluschi d'acqua dolce appartenenti al gruppo degli unionidi quali Anodonta cygnaea e Unio pictorum.

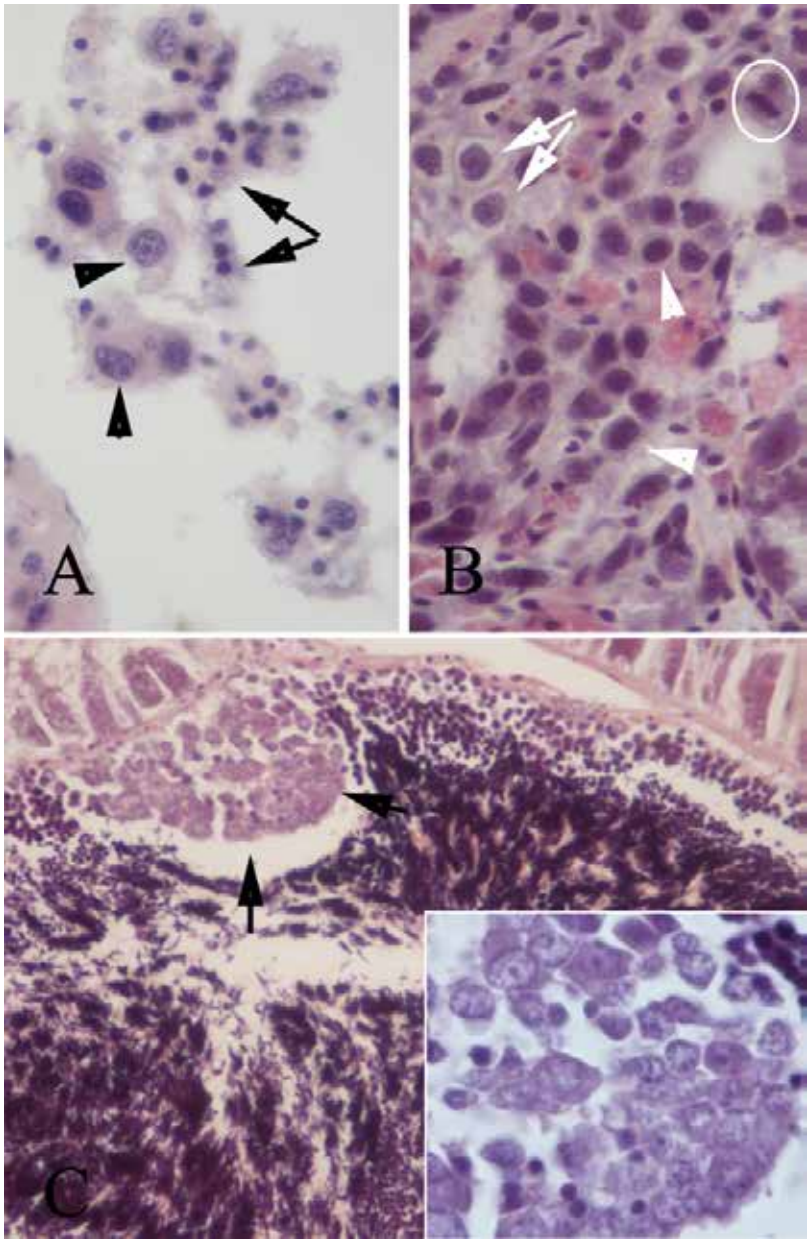


Fig.1. (A) Mytilus galloprovincialis. Neoplasia Emocitaria (NE): caratteristiche citologiche degli emociti neoplastici (punte di freccia) in confronto con gli emociti normali (frecce) (colorazione Ematosilina-Eosina; 100x). (B) M. galloprovincialis. NE: cellule di tipo A (frecce), cellule di tipo B (punte di freccia), mitosi (cerchio) (colorazione Ematosilina-Eosina; 40x). (C) Patella coerulea. Germinoma: massa neoplastica focale costituita da gonociti atipici cresce all'interno del follicolo maschile. Inserto: caratteristiche citologiche delle cellule neoplastiche (colorazione Ematosilina-Eosina; 40x).

Tale forma neoplastica è caratterizzata da una proliferazione di cellule atipiche di probabile origine emocitaria, che nel tempo sostituiscono in parte o totalmente gli emociti normali, invadendo interstizi, tessuti e organi fino a determinare, nella fase terminale della malattia, la morte dell'individuo colpito (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004). Dalla sua prima osservazione sono stati proposti diversi nomi per la malattia, fra cui neoplasia ematopoietica (Yevich and Barszcz, 1977), sarcoma disseminato (Peters, 1988), neoplasia diffusa (Elston et al., 1992) o, più semplicemente, neoplasia emocitaria (NE) (Elston et al., 1988; McGladdery et al., 2001). La NE è ampiamente diffusa fra i bivalvi marini, osservata in almeno 20 specie appartenenti a differenti ecosistemi e aree geografiche, includendo spesso animali importanti dal punto di vista commerciale come C. virginica e O. edulis, Cerastoderma edule, M. Balthica, M. arenaria, ma anche mitili come M. edulis e, più raramente, M. galloprovincialis (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004; Carella et al., 2013;). In Cerastoderma edule la neoplasia diffusa fu descritta per la prima volta nel 1982 nel porto di Cork (Irlanda) (Twomey e Mulcahy, 1988) e, nello stesso periodo, fu anche riscontrata in una popolazione delle coste settentrionali della Bretagna (Francia) (Auffret e Poder, 1986; Poder e Auffret, 1986), mentre recentemente è stata descritta nella parte nord-ovest della Spagna, in Galizia (Carballal et al., 2001; Villalba et al., 2001; Ordás e Figueras, 2005). Fra i mitili mostra bassa prevalenza in M. galloprovncialis, ma raggiunge livelli elevati in M. trossulus e Mytilus edulis, talora provocando gravi danni economici all'industria dell'acquacoltura locale (Ciocan e Sunila, 2005). In alcuni casi è stata registrata in taglie specifiche di età e correlata al periodo di maturazione della gonade (Twomey e Mulcahy 1988; Potts, 1993; Brousseau e Baglivo, 1994; Ford et al., 1997).

Eziologia

Il fattore o i fattori responsabili di tale patologia risultano a tutt'oggi ancora poco chiari. Si ipotizza che differenti tipi di inquinanti (benzine, clordano, pesticidi) (Yevich e Barszcz, 1976; Farley et al., 1991), agenti virali o biotissine algali (Balouet et al., 1986; Twomey e Mulcahy, 1988; Landsberg, 1996) possano promuovere lo sviluppo neoplastico.

Talune specie risultano più suscettibili di altre, suggerendo una predisposizione genetica alla malattia. A tale riguardo, gli unici dati rilevanti sono forniti da Frierman e Andrews (1976), i quali riscontrarono una prevalenza elevata di neoplasia diffusa in due ceppi di Crassostrea virginica prodotti in laboratorio (31/369 = 8,4%), rispetto ai selvatici (39/51000 = 0,08%) esaminati tra il 1964 e il 1973. Gli autori suggerirono che la consanguineità poteva aver provocato una perdita di eterozigosi e predisposto gli animali allo sviluppo della neoplasia. Molto recentemente è stato dimostrato che in ambiente naturale si verifica frequentemente la trasmissione clonale orizzontale della malattia, mediante trasferimento di cellule neoplastiche da animali malati ad animali sani (come si verifica per il Tumore Venereo Trasmissibile del cane e il Sarcoma Trasmissibile Facciale del Diavolo della Tasmania), anche di specie diverse da quella di origine (Metzger et al., 2016).

Citologia della NE

Le cellule neoplastiche nella NE sono grandi (rispetto agli emociti normali), pleomorfe con nucleo vesvicoloso o ipercromatico e alto indice mitotico (Carella et al., 2013; De Vico e Carella, 2015) (fig. 1A). Tuttavia la morfologia cellulare può variare anche notevolmente nelle diverse specie considerate. In Mytilus sp. è stata registrata la presenza di almeno 5 ti-

pi di cellule atipiche, di cui 2 tipi principali (c.d. Cellule Tipo A e Cellule Tipo B) (fig. 1B) e gli altri (cellule indentate, binucleate, multinucleate) sottotipi delle cellule Tipo A e Tipo B (Carella et al., 2013).

Le Cellule di Tipo A hanno forma ovoidale, citoplasma chiaro e nuclei vescicolosi con nucleoli evidenti. Le Cellule di Tipo B sono più grandi, rotonde, con nucleo grande iprecromatico e circondato spesso da una sottile rima citoplasmatica. Le Cellule di Tipo A sono presenti prevalentemente nelle fasi iniziali della malattia, mentre le Cellule di Tipo B predominano nelle fasi avanzate. Nelle fasi intermedie sono rappresentati entrambi i tipi cellulari. L'istogenesi di tali cellule è controversa: secondo alcuni rappresentano citotipi cellulari di distinta derivazione; altri sostengono si tratti di stadi evolutivi di una stessa linea cellulare (Carella et al., 2013).

Anche in C. edule si riconoscono Cellule di Tipo A e Cellule di Tipo B, ma in tale specie i due tipi derivano da cloni differenti e si trasmettono da individuo sano a individuo malato attraverso l'ambiente acquatico (trasmissione orizzontale clonale) (Metzger et al., 2016). Non è stata mai descritta una popolazione mista nello stesso individuo malato.

Profili molecolari coinvolti nella patogenesi della NE.

Tra gli invertebrati, gli omologhi della proteina p53 dei molluschi hanno una maggiore somiglianza strutturale con la corrispondente proteina dei vertebrati rispetto a quelle di CEP-1 (omologo di P53 nel nematode Caenorhabditis elegans), e DMP53 in Drosophila melanogaster (Schmale e Bamberger, 1997; Kelley et al., 2001; Cox et al., 2003; Muttray et al., 2005; Goodson et al., 2006; Lu e Abrams, 2006; Muttray et al., 2007). Tuttavia, mentre nei vertebrati p53, p63 e p73 originano da geni differenti, le isoforme di p53 dei molluschi sono varianti del trascritto primario (Van Beneden et al., 1997; Kelley et al., 2001; Muttray et al., 2005; Goodson et al., 2006; Muttray et al., 2007). La proteina p53 è stata individuata nelle cellule neoplastiche dei molluschi Mytilus edulis, Mytilus trossulus, Mya arenaria, Spisula solidissima, Crassostrea rhizophorae e Crassostrea gigas. In particolare, un omologo della proteina umana Hsp53 è stato clonato e caratterizzato in M. arenaria (Kelley et al., 2001) e presenta un dominio II-V DNA-ligando, un dominio di transattivazione e un dominio MDM2 conservato per il 73% rispetto alla p53 dell'uomo, suggerendo che i meccanismi molecolari che regolano la trascrizione del gene p53 in M. areanaria sono simili a quelli coinvolti nell'espressione umana del gene (Kelley et al., 2001). Differenti studi sono stati effettuati allo scopo di definire il ruolo di tale proteina e di altri componenti della stessa famiglia (p73, p63, p97) nei casi di NE (Kelley et al., 2001; Barker et al., 1997; Stephens et al., 2001); a tale riguardo, in Mya arenaria risulta che, negli emociti neoplastici, la mortalina (un membro della famiglia Hsp70 la cui espressione è fortemente correlata con i livelli di espressione di p53 nei bivalvi malati) (Wadhwa et al., 2002; Siah et al., 2008) sequestra p53 nel citoplasma confinando la proteina in corrispondenza del centriolo e inibendo la sua attività pro-apoptotica e di controllo del ciclo cellulare. In tali bivalvi, l'identità molecolare del sito di legame della mortalina con il p53 è sovrapponibile allo stesso sito della molecola umana per il 97%.

Un fenotipo simile, caratterizzato dal sequestro intracitoplasmatico di p53 a opera della mortalina, si osserva in diversi tumori umani (neuroblastoma indifferenziato, retinoblastoma, carcinomi del colon-retto, carcinomi epatocellulari e glioblastoma). Inoltre la NE in Mya arenaria è l'unico modello animale finora studiato dove la p53 sequestrata nel citoplasma dalla mortalina può essere riattivata sia in vitro sia in vivo, utilizzando farmaci antineoplastici che hanno come target la mortalina umana (p. es. MKT-077) e che sono in grado di indurre apoptosi selettiva degli emociti trasformati (Walker et al., 2012).

Studi citologici e immunoistochimici, suggeriscono inoltre che anche il profilo molecolare

del PCNA può essere coinvolto nella patogenesi della NE, almeno in Mytilus galloprovincialis e in Cerastoderma edule (Carella et al., 2013; De Vico e Carella, 2015). In particolare, negli emociti neoplastici di tali specie, è possibile osservare una redistribuzione anomala del PCNA dal nucleo al citoplasma (e viceversa) a seconda della specie e delle fasi della malattia. In M. galloprovincialis il PCNA ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica nelle Cellule Tipo A (le sole presenti nelle fasi iniziali della malattia in tale specie), mentre ha una localizzazione prevalentemente nucleare nelle Cellule di Tipo B (che caratterizzano le fasi avanzate della malattia). Al contrario, in Cerastoderma edule, nelle Cellule Tipo A (che tipizzano alcune forme monoclonali della malattia in tale specie), il PCNA ha una localizzazione prevalentemente nucleare negli stadi iniziali della malattia, mentre ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica nelle fasi avanzate. Dato che il PCNA è coinvolto non solo nel controllo della proliferazione cellulare, ma anche nella modulazione dell'apoptosi (Banks et al., 2006, De Chiara et al., 2013), è stato suggerito che potesse avere un ruolo nelle fasi di iniziazione e/o progressione della NE in tali bivalvi (Carella et al., 2013). Inoltre il PCNA è ritenuto un bersaglio molecolare emergente nelle malattie sia neoplastiche che infiammatorie dell'uomo.

Neoplasie gonadiche

Le neoplasie gonadiche dei bivalvi possono essere distinte in tre istotipi (Peters et al., 1994):
1. germinoma: proliferazione follicolare di cellule germinali atipiche;
2. neoplasia dello stroma gonadico;
3. gonadoblastoma: un mix di elementi primitivi follicolari e stromali.

Il germinoma

Il germinoma è la forma di neoplasia gonadica più rappresentata fra i molluschi, ma ha un'incidenza minore rispetto alla neoplasia emocitaria. In alcuni casi entrambe le forme sono state riportate nelle stessa specie e area contemporaneamente; per esempio, in M. arenaria nella parte nord est del Nord-America, in C. edule in Irlanda e, in una forma più sporadica, in Macorna calcarea nella parte nord del Canada (Yevich e Barszcz, 1976; Cosson-Mannevy et al., 1984; Twomey e Mulcahy, 1984; Neff et al., 1987; Peters et al., 1994).
È stato riscontrato in diverse specie di bivalvi marini, per lo più nelle popolazioni di Mercenaria mercenaria e Mya arenaria, meno frequentemente in altre specie di bivalvi americane (Peters et al., 1994; Barber, 2004) e nel bivalve Ensis arcuatus in Galizia (Darriba et al., 2006). In Europa, Alonso et al. (2001), riportano una neoplasia in M. galloprovincialis in Galizia, mentre descrivono cellule neoplastiche a livello dei follicoli gonadici originanti dall'epitelio germinativo in Cerastoderma edule (Twomey e Mulcahy, 1988). Nei molluschi gasteropodi è stato riportato un solo caso, in particolare nella specie Patella coerulea (Carella et al., 2009) (fig. 1C). I dati presenti in letteratura parlano di una bassa incidenza (7% in M. mercenaria, 7-10% in Ensis arcuatus, 11% in Mercenaria spp e 19% in Mya arenaria), con variazioni in rapporto a sesso e stagione. Barber (2004) sottolinea però che l'incidenza di tale forma neoplastica può risultare sottostimata, in quanto tali lesioni risultano talvolta focali, e distribuite in pochi tubuli, specialmente nelle fasi iniziali della malattia, sfuggendo così all'osservazione istologica.
Studi epidemiologici riportano il 40% di tumori gonadici in Mya arenaria nell'area americana del Maine e il 60% in Mercenaria spp. in Florida. Studi in queste aree geografiche identificano, nell'uomo, numerosi casi di mortalità legata a tumori ovarici, con una percentuale maggiore rispetto alla media nazionale (Gardner et al., 1991). Tale aumento nei tassi di

mortalità è stata correlata a un aumento nell'utilizzo di certe tipologie di erbicidi nelle zone agricole. Recenti studi compiuti su campo dall'ERL/N (U.S. EPA Environmental Research Laboratory, Narragansett, USA) identificano forme epizootiche di germinoma in tre diverse popolazioni di Mya arenaria in differenti aree geografiche. Studi eziologici ed epidemiologici rivelano che tutte e tre le aree sono soggette all'esposizione a erbicidi. In particolare, dosi massive di Tordon 101 (picloram) 2,4-D (2,4- acido diclorofenossiacetico) e il 2,4,5-T (2 acido, 4,5-triclorofenossiacetico) sono state utilizzate nella selvicoltura e nelle produzioni di mirtilli nelle stesse aree. Il 2,4-D e il 2,4,5-T non sono riportati come cancerogeni, e il TCDD (dioxin; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin), il prodotto di sintesi del 2,4,5-T viene indicato come uno dei più potenti cancerogeni ambientali conosciuti. Allo stesso modo, casi di germinoma sono stati riportati in Mercenaria spp. in Florida in aree interessate da rilevanti apporti provenienti da dilavamenti agricolturali oltre che da rifiuti di origine urbana. L'ipotesi di una eziologia chimica da erbicidi è stata poi ulteriormente rafforzata da studi sperimentali, che hanno correlato al carcinogeno chimico attività mutagena e manifestazione neoplastica in vertebrati acquatici e mammiferi esposti. Studi eziopatogenetici effettuati sui casi di Germinoma in Mya arenaria, hanno dimostrato che l'induzione del tumore in animali esposti a differenti dosi della diossina TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina) anche detta Diossina Seveso, componente di diversi diserbanti, non avviene attraverso il recettore arilico per gli idrocarburi AHR allo stesso modo dei vertebrati. Da studi sperimentali, invece, è risultato che la via di azione è indipendente da AHR, rivelando un meccanismo alternativo che coinvolge proteine che presentano elevata similarità di sequenza con E6AP dei mammiferi, un omologo E6AP Carbossi Terminale (HETC)-E3 ubiquitina ligasi. In particolare, nel papilloma-virus umano, responsabile del cancro alla cervice, la principale azione antiapoptotica virale viene esplicata attraverso il legame di E6 con la proteina cellulare P53. E6 si lega a P53 attraverso un complesso ternario con la ligasi-ubiquitina, E6AP; tale complesso induce poi l'ubiquitinazione e la degradazione di p53 mediante il proteasoma 26S (Huibregtse et al., 1991). Individui di M. arenaria affetti da germinoma presentano, in effetti, elevati livelli di espressione di E3 (MaE3) e bassi livelli di p53 (MaP53), ma a tutt'oggi una diretta associazione fra i due meccanismi deve essere ancora completamente verificata (Olberding et al., 2004).

Conclusioni

Secondo Wessler (1976) i modelli animali sono organismi viventi in cui un processo patologico spontaneo o indotto può essere studiato in quanto in uno o più aspetti ripropone lo stesso fenomeno che si osserva nell'uomo. I modelli animali hanno storicamente svolto un ruolo critico nella studio delle malattie umane e nell'identificazione in vivo di nuovi agenti e trattamenti terapeutici (McGonigle e Ruggeri, 2014). Tuttavia, in seguito ai numerosi fallimenti di studi clinici di nuove entità chimiche che avevano mostrato profili pre-clinici promettenti, i modelli animali in tutte le aree terapeutiche sono sempre più criticati per la loro limitata capacità di predire l'efficacia e la sicurezza di nuovi farmaci per l'uomo (McGonigle e Ruggeri, 2014). Si ritiene infatti che il livello di traslazione, dagli studi sugli animali all'uomo, di nuove molecole ad attività antineoplastica non superi l'8% (Mak et al., 2014). Tuttavia, piuttosto che abbandonare i modelli animali nel processo di scoperta di nuovi farmaci, i ricercatori concordano sul fatto che sono necessari maggiori sforzi per migliorare il valore predittivo di quelli esistenti, nonché per lo sviluppo di nuovi modelli animali di malattia. In questo contesto, la preoccupazione per il concetto di costo etico in esperimenti su animali vertebrati ha portato alla generale accettazione delle tre "R" di Russell e Burch (Replacement, Reduction e Refinement) (Russell et al., 1959); per tale

motivo, molti ricercatori si rivolgono oggi a modelli non vertebrati, tenendo presente che la maggior parte degli animali sono molto simili tra di loro soprattutto a livello cellulare e molecolare (Thompson e Marsh, 2003). Inoltre, quest'ultima soluzione può fornire una vasta diversificazione del profilo genetico dei modelli, in grado di migliorare il nostro risultato traslazionale (Austand, 2009).

Tra i nuovi modelli invertebrati nella ricerca biomedica, i molluschi stanno emergendo come i più promettenti in molte aree, come quelle che riguardano lo studio del sistema immunitario-neuro-endocrino, le malattie neurodegenerative, l'infiammazione e cancro (De Vico e Carella, 2012; Tascedda, 2015; De Vico e Carella, 2015). Nonstante la distanza filogenetica dai mammiferi, i molluschi condividono con essi un gran numero di geni e profili molecolari coinvolti nella patogenesi delle malattie: ad esempio sviluppano sia le infiammazioni sia il cancro con aspetti spesso sovrapponibili a quelli dei vertebrati, uomo incluso (De Vico e Carella, 2012; 2015).

Sulla base dei dati disponibili in letteratura, gli emociti neoplastici dei bivalvi possono essere considerati modelli emergenti sia per i tumori umani che mostrano un fenotipo mortalin-based, sia per quelle malattie in cui il PCNA può essere individuato come utile bersaglio terapeutico (alcuni linfomi, mielomi e tumori della mammella) (Kamel et al., 1992; Bechtel et al., 1998; Muller et al., 2013), rappresentando uno dei modelli più rilevanti attualmente disponibili per studi sperimentali preclinici in oncologia comparata (Walker, 2012). La possibilità di mantenere colture stabili di cellule neoplasiche di Mya arenaria (Walker et al., 2009) consente oggi di programmare test su nuovi e più specifici farmaci antineoplastici su linee cellulari di invertebrato con caratteristiche molecolari stabili e standardizzate e con identità molecolare rispetto all'uomo spesso superiore a quella di modelli vertebrati (Walker e Böttger, 2008). Inoltre, sfruttando la trasmissibilità di alcuni tumori dei bivalvi è possibile mantenere nel tempo in laboratorio popolazioni di organismi malati su cui effettuare studi in vivo relativi ai complessi rapporti tra tumore e sistema immunitario in organismi non immunodepressi artificialmente, e/o effettuare saggi terapeutici. Il fatto che i molluschi si ammalino di cancro in modo naturale e che le specie colpite siano almeno una ventina, fornisce la possibilità di studiare i meccanismi generali della cancerogenesi su una popolazione di organismi con una grande diversificazione genetica, contrariamente a ciò che avviene con i modelli murini oggi disponibili

Alla luce di quanto esposto, i bivalvi sono ormai da ritenersi modelli emergenti di grande valore in oncologia comparata; la conoscenza sempre più approfondita dei meccanismi molecolari coinvolti nella cancerogenesi in queste specie può portare all'individuazione di bersagli molecolari potenzialmente utili nella scoperta di nuovi farmaci per l'uomo.

Bibliografia

- AboElkhair, M., Synard, S., Siah, A., Pariseau, J., Davidson, J., Johnson, G., Greenwood, S.J., Casey J.W., Berthe F.C.J., Cepica A., 2009. Reverse transcriptase activity in tissues of the soft shell clam Mya arenaria affected with haemic neoplasia. Journal of Invertebrate Pathology 102, 133-140.
- Alderman, D.J., Van Banning, P., Perez-Colomer, A., 1977. Two European oyster (Ostrea edulis) mortalities associated with an abnormal haemocytic condition. Aquaculture 10, 335-340.
- Auffret, M., Poder, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle Cerastoderma edule II. Electron microscopical study. Aquaculture 58, 9-15.
- Austand, SN., 2009. Is There a Role for New Invertebrate Models for Aging Research? J Gerontol A Biol Sci Med Sci All rights reserved. Vol. 64A, No. 2, 192–194
- Banks D, Min Wu, Leigh Ann Higa, Nadia Gavrilova, Junmin Quan, Tao Ye, Ryuji Kobayashi, Hong Sun & Hui Zhang, 2006. L2DTL/CDT2 and PCNA Interact with p53 and Regulate p53 Polyubiquitination and Protein Stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 Complexes, Cell Cycle, 5:15, 1719-1729,
- Bechtel, PE., Robert J. Hickey, Lauren Schnaper, et al. 1998. A Unique Form of Proliferating Cell Nuclear Antigen Is Present in Malignant Breast Cells Cancer Res 58:3264-3269.
- Barber, B.J., 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. Aquatic Living Resources 17: 449-466.
- Balouet, G., Poder, M., Cahour, A. and Auffret, M., 1986. Proliferative hemocytic condition in Europeanflat oysters (Ostrea edulis) from Breton Coasts: A6-year survey. Journal of Invertebrate Pathology 48, 208-215.
- Brousseau, D.J. and Baglivo, J.A., 1991. Disease progression and mortality in neoplastic Mya arenaria in the field. Marine Biology 110, 249-252.
- Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., Villalba, A., 2001. Parasites and pathologic conditions of the cockle Cerastoderma edule populations of the coast of Galicia (NW Spain). Journal of Invertebrate Pathology 78: 87-97.
- Carella, F., Restucci, B., Maiolino, P. and De Vico, G., 2009. A case of Germinoma in a Limpet (Patella coerulea). Journal of Invertebrate Pathology 101: 154-156.
- Carella F, Figueras A, Novoas B, De Vico G., 2013 Cytomorphology and PCNA expression pattern in bivalves Mytilus galloprovincialis and Cerastoderma edule with haemic neoplasia. Dis. Aquat. Org. 105: 81-87.
- Ciocan, C. and Sunila, I., 2005. Disseminated neoplasia in blue mussels, Mytilus galloprovincialis, from the Black Sea. Romania Marine Pollution Bulletin 50, 1335-1339.
- Collinge, W.E., 1891. Note on a Tumour in Anodonta cygnaea Linn. Journal of Anatomy and Physiology 25: 154.
- Cooper, K.R., Brown, R.S., Chang, P.W., 1982. The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, Mya arenaria. Journal of Invertebrate Pathology 39, 149-157.
- Cosson-Mannevy, M.A., Wong, C.S., Cretney, W.J., 1984. Putative neoplastic disorders in mussels (Mytilus edulis) from southern Vancouver Island waters, British Columbia. Journal of Invertebrate Pathology 44, 151-160.
- Cox, R.L., Stephens, R.E., Reinisch, C.L., 2003. p63/73 Homologues in surf clam: novel signalling motifs and implications for control of expression. Gene 320, 49-58.
- Darriba, S., Iglesias, D., Harshbarger, J.C., López, C., 2006. Germinoma in razor clam Ensis arcuatus (Jeffreys, 1865) in Galicia (NW Spain) Journal of Invertebrate Pathology, 93: 140-142.
- De Chiara, Alessia; Pederzoli-Ribeil, Magali; Mocek, Julie, 2013 et al.Characterization of

cytosolic proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in neutrophils: antiapoptotic role of the monomer. j. Of leukocyte Biology, 94 Issue: 4, Pages: 723-731.
– De Vico, G., Carella, F., 2012. Morphological features of the inflammatory response in molluscs. Res. Vet. Sci. 93, 1109–1115.
– De Vico, G., Carella, F., 2015. Tumors in invertebrates: molluscs as an emerging animal model for human cancer. ISJ 12: 19-21.
– Elston, R.A., Kent, M.L., Drum, A.S., 1988. Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel Mytilus edulis. Disease of Aquatic Organism 4, 135-142.
– Elston, R.A., Moore, J.D., Brooks, K., 1992. Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. Reviews in Aquatic Sciences 6, 405-466.
– Farley, C.A., 1969a. Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, Crassostrea virginica and Crassostrea gigas. National Cancer Institute Monographs 31, 541-555.
– Farley, C.A., 1969b, Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (Mytilus edulis). Journal of the National Cancer Institute 43, 509-516.
– Farley, C.A., 1976. Proliferative disorders in bivalve molluscs. Marine Fisheries Review 38, 30-33.
– Farley, C.A. and Sparks A.K., 1970. Proliferative diseases of hemocytes, endothelial cells, and connective tissue cells in mollusks. Bibliographic Haematology 36: 610-617.
– Farley, C.A., Otto, S.V., Reinisch, C.L., 1986. New occurrence of epizootic sarcoma in Chesapeake Bay soft shell clams, Mya arenaria. Fishery Bulletin 84, 851-857.
– Farley, C.A., Plutschak, D.L., Scott, R.F., 1991. Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma in Maryland softshell clams, Mya arenaria, 1984- 1988. Environmental Health Perspectives 90, 35-41.
– Ford, S.E., Barber, R.D., Marks, E., 1997. Disseminated neoplasia in juvenile eastern oysters Crassostrea virginica, and its relationship to the reproductive cycle. Disease of Aquatic Organism 28, 73-77.
– Frierman, E.M. and Andrews, J.D., 1976. Occurrence of hematopoietic neoplasms in Virginia oysters (Crassostrea virginica). Journal of National Cancer Institute 56, 319-322
– Gardner, G.R., Yevich, P.P., Hurst, J., Thayer, P., Benyi, S., Harshbarger, J.C., Pruell, R.J., 1991. Germinomas and teratoid siphon anomalies in softshell clams, Mya arenaria, environmentally exposed to herbicides. Environmental Health Perspective 90: 43-51.
– Goodson, M.S., Crookes-Goodson, W.J., Kimbell, J.R., McFall-Ngai, M.J., 2006. Characterization and role of p53 family members in the symbiont-induced morphogenesis of the Euprymna scolopes light organ. Biological Bulletin 211, 7-17.
– Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M., 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. EMBO Journal 10: 4129-4135.
– Kamel, O.W., Warnke, R.A., Banks, P.M., 1992. Localization of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA/Cyclin) in Workshop cases pf Hodgkin's Diseases and Non-Hodgkin Lymphomas. Seminars in Diagnostic Pathology, Vol 9,n. 4, 331-314.
– Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.E., Farell, J.H., Van Beneden, R.J., Reinisch, C.L., Lesser, M.P., Stephens, R.E., Walker, C.W., Reinisch, C.L., 2001. Multiple protein differences distinguish clam leukemia cells from normal hemocytes: evidence for the involvement of p53 homologues. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 129, 329-338.
– Landsberg, J.H., 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connections? Journal of Shellfish Research 15 (2), 203-230.
– Leavitt, D.F., McDowell, Capuzzo, J., Smolowitz, R.M., Miosky, D.L., Lancaster, B.A.,

1990. Hematopoietic neoplasia in Mya arenaria: prevalence and indices of physiological condition. Marine Biology 105, 313-321.
– Lu, W.J. and Abrams, J.M., 2006. Lessons from p53 in non-mammalian models. Cell Death and Differentiation 13, 909-912.
– IWY Mak, N Evaniew, M Ghert., 2014. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment Am J Transl Res, 6(2):114-118
– M. J. Metzger, A Villalba, MJ. Carballal, D Iglesias, J Sherry, C Reinisch, AF. Muttray, SA. Baldwin & S P. Goff., 2016. Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species Nature 534, 705–709.
– McGladdery, S.E., Reinisch, C.L., MacCallum, G.S., Stephens, R.E., Walker, C.L., Davidson, J.T., 2001. Haemic neoplasia in soft-shell clams (Mya arenaria): Recent outbreaks in Atlantic Canada and discovery of a p53 gene homologue associated with the condition. Bulletin of the Aquacultural Association of Canada 101-3, 19-26.
– Paul McGonigle, Bruce Ruggeri, 2014. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. Biochemical Pharmacology, 87, 161-171
– Muller R, Misund K, Holien T, Bachke S, Gilljam KM, et al. 2013. Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Protein Interactions Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. PLoS ONE 8(7): e70430. doi:10.1371/journal.pone.0070430
– Muttray, A.F., Cox, R.L., St-Jean, S.D., van Poppelen, P., Reinisch, C.L., 2005. Identification and phylogenetic comparison of p53 in two distinct mussel species (Mytilus). Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Pharmacology,
– Toxicology and Endocrinology 140, 237-250.
– Muttray, A.F., O'Toole, T.F., Morrill, W., Van Beneden, R.J., Baldwin, S.A., 2010. An invertebrate mdm homolog interacts with p53 and is differentially expressed together with p53 and Ras in neoplastic Mytilus trossulus haemocytes. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, (156) 298-308.
– Olberding, K.E., Kelley, M.L., Butler, R. A. and Van Beneden, R.J., 2004. A HECT E3 ubiquitin-protein ligase with sequence similarity to E6AP does not target p53 for degradation in the softshell clam (Mya arenaria). Mutation Research 552, 61-71.
– Ordás, M.C. and Figueras, A., 2005. Histopathological study of abnormal mortalities of cockle (Cerastoderma edule) in Carril (Galicia, NW Spain). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 25 (3): 124-130.
– Pauley, G.B., 1969. A critical review of neoplasias and tumor-like lesions in mollusks. National Cancer Institute Monographs 31, 509-529.
– Peters, E.C., 1988. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. American Fisheries Society, Special Publication 18, 74-92.
– Peters, E.C., Yevich, P.P., Harshbarger, J.C., Zaroogian, G.E., 1994. Comparative histology of gonadal neoplasms in marine bivalve molluscs. Disease of Aquatic Organism, 20: 59-76.
– Poder, M., Auffret, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle Cerastoderma edule I. Morphology and population survey in Brittany, France. Aquaculture 58, 1-8.
– Potts, M.S., 1993. Effects of Hematopoietic Neoplasia on Physiological Processes in the Soft-shell Clam, Mya arenaria (Linne.). Ph.D. Dissertation, University of New Hampshire, pp. 150.
– Russell WMS, Burch RL. , 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen.
– Schmale, H. and Bamberger, C., 1997. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. Oncogene 15, 1363-1367.
– Siah, A., Delaporte, M., Pariseau, J., McKenna, P., Berthe, F.C.J., 2008. Patterns of p53,

p73 and mortalin gene expression associated with haemocyte polyploidy in the soft-shell clam, Mya arenaria. Journal of Invertebrate Pathology 98, 148-152.
– Sindermann, C.J., 1990. Principal diseases of marine fish and shell!sh, vol. 2., 2nd ed. Academic Press.
– Sparks, A.K., 1985. Synopsis of Invertebrate Pathology Exclusive of Insects. Elsevier, Amsterdam.
– Tascedda F., D. Malagoli, A. Accorsi, G. Rigillo, J.M.C. Blom, E. Ottaviani : Molluscs as models for translational medicine. Med Sci Monit Basic Res, 2015; 21: 96-99
– Twomey, E. and Mulcahy, M.F., 1988. Transmission of a sarcoma in the cockle Cerastoderma edule (Bivalvia; Mollusca) using cell transplants. Developmental and Comparative Immunology 12, 195-200.
– Villalba, A., Carballal, M.J., Lopez, C., 2001. Disseminated neoplasia and largefoci indicating heavy haemocytic in!ltration in cockles Cerastoderma edule from Galicia (NW Spain). Disease of Aquatic Organism 46, 213-216.
– Yevich, P.P. and Barszcz, C.A., 1976. Gonadal and hematopoietic neoplasms in Mya arenaria. Marine Fisheries Review 38, 42-43.
– Yevich, P.P., Barszcz, C.A., 1977. Neoplasia in soft-shell clams (Mya arenaria) collected from oil-impacted sites. Annals of the NY Academy of Sciences 298, 409-426.
– Van Beneden, R.J., Walker, C.W. and Laughner, E.S., 1997. Characterization of gene expression of a p53 homolog in the soft-shell clam (Mya arenaria). Molecular Marine Biology and Biotechnology 6, 116-122.
– Walker C., 2001. Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (Mya arenaria), a naturally-occurring model for human cancer. Oncogene 20, 748-758.
– Wadhwa, R., Yaguchi, T., Hasan, M.K., Mitsui, Y., Reddel, R.R., Kaul, S.C., 2002. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. Experimental Cell Research 274: 246-253.
– Walker C. Mortalin in invertebrates and the Induction of apoptosis by wild-type p53 following defeat of mortalin-based cytoplasmic sequestration in cancerous clam hemocytes. In: Kaul SC, Wadhwa R (eds), Mortalin Biology: life, stress and death, Chapter 6, 97 DOI 10.1007/978-94-007-3027-4_6, © Springer Science+Business Media, 2012.
– Walker C. & S. Böttger, 2008. A naturally occurring cancer with molecular connectivity to human diseases , Cell Cycle, 7:15, 2286-2289
– Walker C., S. Böttger, J Mulkern, E Jerszyk, MLitvaitis and M Lesser, 2009. Mass Culture and Characterization of Tumor Cells from a Naturally OccurringInvertebrate Cancer Model: Applications for Human and Animal Disease and EnvironmentalHealth. Biological Bulletin, Vol. 216, No. 1, pp. 23-39
– Wessler S., 1976. Introduction: What is a model? In: Animal Models of Thrombosis and Hemorrhagic Diseases. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 1976:xi.

2.4
MODELLI DI ALTRE MALATTIE

GLI ANIMALI DA REDDITO COME MODELLI PER PATOLOGIE UMANE: APPROCCIO PROTEOMICO

CRISTINA LECCHI, FABRIZIO CECILIANI

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Introduzione

I modelli animali rappresentano uno strumento essenziale per lo studio delle patologie dell'uomo, dal momento che forniscono una visione olistica di come si sviluppa una patologia nell'ambito di un sistema complesso. In aggiunta ai modelli animali tradizionali, come topo, ratto e coniglio, l'attenzione si sta progressivamente estendendo a specie alternative, fra le quali gli animali di interesse zootecnico. Il vantaggio principale di queste specie, come per esempio suini e bovini, è che ogni scoperta effettuata sulle funzioni di uno specifico gene o proteina si può riflettere immediatamente sulle produzioni animali. Ulteriori vantaggi sono rappresentati dal fatto che gli animali da allevamento sono spesso colpiti dagli stessi microorganismi patogeni che colpiscono l'uomo, come per esempio *Brucella abortus, Staphylococcus aureus* e *Streptococcus suis*. Le tecniche di proteomica costituiscono un potente mezzo grazie al quale ottenere i profili proteici sia degli agenti patogeni sia dei tessuti e dei fluidi biologici dell'ospite, permettendo l'identificazione di proteine da utilizzare come target in diagnostica immunologica, in farmacologia o per la produzione di vaccini. La fig. 1 presenta un esempio di workflow delle tecniche proteomiche.

L'applicazione delle tecniche proteomiche applicate alla caratterizzazione degli animali da allevamento impiegati come modelli per le patologie umane sta muovendo ora i suoi primi passi (1). Il numero delle pubblicazioni relative a questo argomento è però in costante aumento (fig. 2), anche sulla base della recente caratterizzazione dei genomi bovini (2) e suini (3), che ha inoltre colmato almeno in parte il divario di informazioni che esisteva con i modelli animali tradizionali, i cui genomi erano disponibili già da alcuni anni.

In questo articolo verranno illustrati alcuni esempi di tecniche proteomiche applicate allo studio degli animali da allevamento come modelli per lo studio delle patologie umane (fig. 3). Verranno presi in considerazione unicamente animali effettivamente utilizzati nell'ambito delle produzioni zootecniche, e non animali transgenici o knock out, la cui utilizzazione non ha un riscontro nell'ambito delle produzioni animali.

Il maiale come modello per lo studio delle patologie umane

La specie suina rappresenta uno dei modelli maggiormente utilizzato per lo studio delle patologie umane (4). Nell'ambito dei mammiferi non-primati, il maiale è la specie evolutivamente più simile all'uomo, sia per quello che riguarda l'anatomia sia per i principali processi fisiologici. Queste similitudini hanno messo in secondo piano gli elevati costi di allevamento e il lento ciclo riproduttivo, se paragonati ai piccoli roditori. La recente pubblicazione del genoma suino (3) ha evidenziato che in più di 100 patologie metaboliche, neurodegenerative e cardiache il suino presenta le stesse modificazioni aminoacidiche (5).

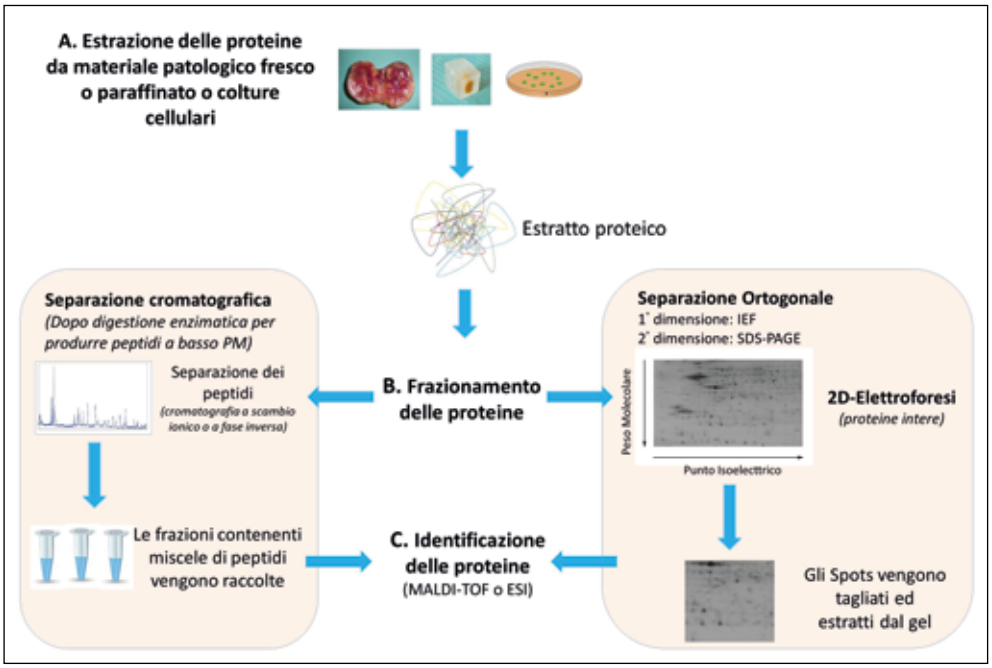


Figura 1. Workflow delle procedure di analisi proteomica. Il workflow proteomico inizia con l'estrazione di proteine da cellule, tessuti o materiali d'archivio in paraffina. Il materiale estratto viene quindi separato mediante elettroforesi bi-dimensionale (pannello a destra), per quello che riguarda le proteine intere, oppure cromatografia dopo digestione (pannello a sinistra). La elettroforesi bi-dimensionale prevede una separazione delle proteine mediante isoelettofocalizzazione, e un ulteriore passaggio di separazione sulla base del peso molecolare. I differenti spot, ciascuno contenenti una proteina, vengono quindi rimossi dal gel e digeriti con tripsina o altri enzimi specifici, e i peptidi derivati. La sequenza dei peptidi derivati viene eseguita mediante spettrometria di massa, e la determinazione delle proteine viene ottenuta mediante software bioinformatici. La separazione cromatografica richiede invece una digestione preliminare dei peptidi, la cui miscela viene frazionata mediante tecniche cromatografiche. Una volta ottenute frazioni meno complesse, l'identificazione dei peptidi e la loro sequenza viene ottenuta come precedentemente descritto.

Patologie intestinali

I modelli suini sono da tempo utilizzati per lo studio di diversi aspetti legati all'apparato gastroenterico e alle malattie legate alla nutrizione, considerando quanto il sistema immunitario dell'apparato gastroenterico (6) sia analogo al corrispondente umano.

L'approccio proteomico è stato utilizzato per chiarire l'impatto del latte artificiale sullo sviluppo dell'enterocolite necrotica (NEC) nei suinetti prematuri. I neonati passano da una alimentazione parenterale attraverso la placenta a una enterale, costringendo il sistema immunitario ad adattarsi alla presenza di diversi microorganismi commensali. La NEC insorge nel neonato pre-termine proprio al momento del passaggio al latte artificiale (7). Jang *et al*. (8) hanno studiato il piccolo intestino dei suinetti prematuri mediante tecniche proteomiche

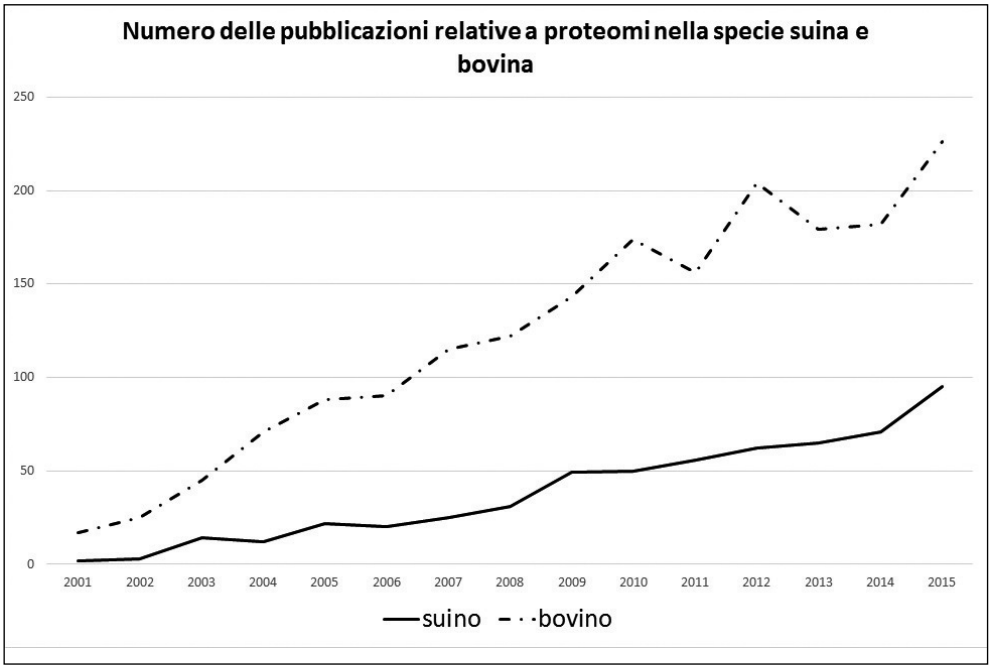


Figura 2. Numero delle pubblicazioni sull'applicazione delle tecniche di proteomica nelle specie suina e bovina

evidenziando un cambiamento significativo nel profilo proteico dopo l'introduzione di diete specifiche che portano all'insorgenza della NEC. Il profilo proteico, ottenuto mediante elettroforesi bi-dimensionale e caratterizzazione dei peptidi e peptide mass fingerprinting, ha rilevato un aumento di proteine coinvolte nello stress ossidativo, come per esempio la Mn-superossido dismutasi, e una diminuzione di alcune proteine coinvolte nel metabolismo energetico e nel trasporto dell'ossigeno. Il medesimo modello è stato impiegato per valutare come varia il profilo proteico dell'intestino a seguito della introduzione dell'alimentazione enterale (9). Il latte artificiale causa una diminuzione delle proteine coinvolte nel metabolismo dei carboidrati e delle proteine subito dopo la nascita, determinando atrofia e arresto dello sviluppo dei villi. Gli studi proteomici sono stati estesi anche alla colonizzazione batterica in seguito a NEC (10) e alla sindrome dell'intestino corto (short bowel syndrome, SBS) (11). L'espressione delle proteine che legano gli acidi grassi risulta aumentata dopo la resezione intestinale, suggerendo che il metabolismo lipidico/degli acidi grassi può rappresentare uno dei principali eventi patogenetici durante l'insorgenza della malattia; questo risultato fornisce inoltre indicazioni importati su come l'intestino si adatta agli eventi traumatici.

Malattie batteriche

Maiali e uomini presentano una parallela suscettibilità ad alcune malattie batteriche. *Streptococcus suis*, per esempio, è un importante patogeno del maiale ed è un agente zoonotico, responsabile dell'insorgenza della meningite in entrambe le specie. Applicate su un modello suino di meningite da streptococco, le tecniche proteomiche hanno permesso di identifica-

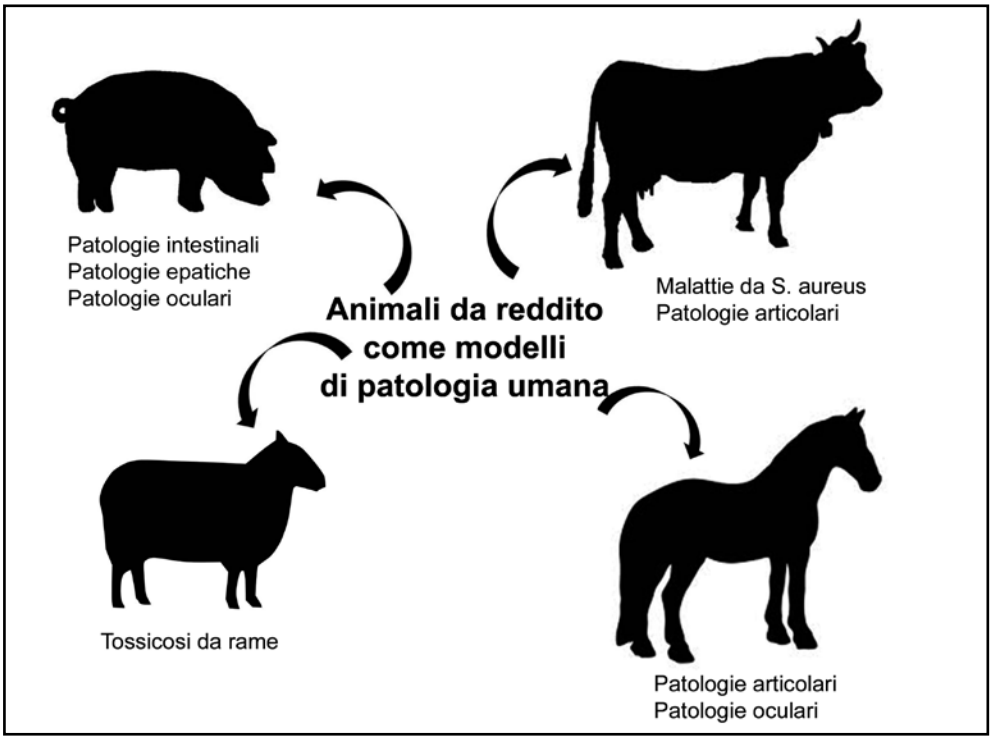


Figura 3. Modelli animali di patologie umane

re il precursore della muramidase-released protein come il principale fattore di virulenza del sierotipo 2 di *Str. suis* (12), e una adesina specifica che ha permesso di chiarire la patogenesi della meningite da streptococco, indicando dei potenziali targets vaccinali e biomarkers di patogenicità (13). Anche i meccanismi di patogenicità di *Clostridium difficile*, che è il principale agente patogeno di diverse patologie intestinali associate all'utilizzo di antibiotici, sono stati studiati mediante tecniche proteomiche, utilizzando come modello il piglet ligated-loop (legatura intestinale). Nei tratti intestinali isolati e legati sono state inoculate colture di *C. difficile;* dopo alcune ore i batteri sono stati recuperati e il proteoma è stato caratterizzato al fine di individuare modificazione conseguenti alla incubazione *in vivo* (14). Grazie allo studio condotto nel suino, è possibile ora identificare possibili bersagli diagnostici e terapeutici delle infezioni da *C. difficile* nell'uomo.

Il modello suino è stato impiegato anche per capire come un patogeno sia in grado di adattarsi all'ambiente ospite senza determinare l'insorgenza di patologie nell'ospite stesso, costituendo quindi un potenziale fattore di rischio per altri individui o specie. I suini infatti sono portatori asintomatici di *Salmonella typhimurium*, uno dei principali patogeni alimentari nella filiera del suino. Infezioni sperimentali *in vivo*, seguite dall'analisi dei linfonodi mesenterici mediante elettroforesi bi-dimensionale differenziale e spettrometria di massa, hanno mostrato un complesso network di interazione tra *Salmonella* e il sistema immunitario del suino, con attivazione della piroptosi, un processo di morte cellulare programmata conseguente alla presenza di batteri all'interno della cellula (15).

Malattie epatiche, cardiovascolari e oculari.

I suini di razza Ossabaw vengono utilizzati come modello di steatoepatite e sindromi metaboliche, poiché sviluppano steatoepatiti non alcoliche molto simili a quelle umane (16). Più di 1000 proteine sono state identificate mediante proteomica, e 160 fra queste sono risultate essere espresse in modo differente tra controlli e suini alimentati con varie diete. Le proteine differenzialmente espresse rispecchiano quelle identificate nelle epatiti non alcoliche umane, confermando l'affidabilità del modello.

Sulla base del fatto che i principali indicatori di funzionalità cardiaca nel maiale, come la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca e il flusso sanguigno miocardico, sono molto simili a quelli umani (7), sono stati condotti numerosi studi utilizzando il maiale come modello, come per esempio l'infarto del miocardio come modello di ipossia e riossigenazione (18) e l'ischemia cronica del miocardio, che è stata studiata alternando stenosi aortica e riperfusione (19).

Dal momento che l'occhio umano e quello del maiale sono simili per dimensione, architettura e rapporto dei fotorecettori coni/bastoncelli, non sorprende che il maiale sia utilizzato come modello delle patologie oculari umane (20). Il proteoma dei melanosomi, gli organelli deputati alla produzione di pigmenti nelle cellule epiteliali della retina, è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa (21).

Il cavallo come modello di patologie oculari e articolari

Benché l'impiego della proteomica nello studio delle malattie equine sia ancora agli inizi, soprattutto se confrontato con altre specie animali, due malattie, che trovano riscontro in medicina umana, sono studiate mediante tecniche proteomiche: l'uveite ricorrente del cavallo e l'osteoartrite/osteocondrosi. L'uveite ricorrente è la causa primaria di cecità nei cavalli (22), ed è considerata un buon modello dell'uveite autoimmune umana, poiché è recidivante e ha in comune con essa alcuni antigeni (23). L'uveite spontanea può essere studiata a tutti gli stadi mediante un prelievo del corpo vitreo anche in grandi quantità, caratteristica che permette l'analisi sul singolo prelievo anziché sul pool, necessario qualora si lavori con modelli murini. L'analisi di campioni di corpo vitreo patologici mediante cromatografia seguita da spettrometria di massa ha permesso di identificare altre caratteristiche in comune tra l'uveite del cavallo e dell'uomo (24), dimostrando come le cellule gliali del Müller ricoprano un ruolo importante nell'aumento delle citochine proinfiammatorie (25). L'applicazione di tecniche proteomiche ha permesso inoltre di identificare alcuni biomarkers, come il PEDF, che potrebbero rivelarsi importanti nella diagnosi precoce di uveite autoimmune nell'uomo (26).

Per quanto riguarda le patologie articolari, la fisiopatologia della cartilagine articolare del cavallo è stata ben caratterizzata, motivata dgli interessi economici del settore agonistico. Le caratteristiche comuni tra uomo e cavallo comprendono la limitata capacità rigenerativa, il ridotto spessore e la ripartizione del carico sulla cartilagine (27). Recentemente è stato messo a punto un metodo per lo studio dell'osso subcondrale e della cartilagine epifisaria, che prevede l'estrazione con fenolo a partire da campioni di soggetti sia sani sia malati, analisi elettroforetica bi-dimensionale e identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa (28). Il profilo proteico del liquido sinoviale di campioni prelevati da cavalli affetti da osteoartrite e osteocondrosi (29) ha mostrato una deregolazione di numerose proteine, fornendo numerosi biomarkes per la diagnosi precoce di patologie articolari. Uno studio simile, condotto su un modello bovino con l'obiettivo di studiare la risposta della cartilagine alla compressione meccanica e al trattamento con citochine pro-infiammatorie, ha permesso di identificare numerose proteine associate alla risposta da stress meccanico dei condrociti (30).

L'allenamento e l'attitudine allo sport dei cavalli sono stati impiegati come modelli per valutare la fatica e le performance degli atleti in medicina umana. Biopsie muscolari sono sta-

te analizzate mediante 2DE identificando nuovi biomarkers dell'eccessivo allenamento nel cavallo, che potenzialmente possono essere impiegati per lo stesso scopo in medicina umana (31). Tali proteine sono state successivamente identificate anche nel plasma, permettendo quindi un prelievo meno traumatico e potenzialmente dannoso per il muscolo (32).

Il bovino come modello di malattie infettive

Uomini e bovini hanno in comune numerosi patogeni, tra cui *B. abortus*, che causa aborto nelle bovine e infezioni croniche nell'uomo, e *S. aureus*, che causa mastite nelle bovine e un'ampia gamma di patologie nell'uomo. Diversi studi proteomici sono stati condotti per caratterizzare sierotipi differenti di questi patogeni. La caratterizzazione di *B. abortus* mediante immunoproteomica ha permesso di poter distinguere gli animali vaccinati da quelli infettati (33), fornendo importanti informazioni per sviluppare test immunologici specifici per diagnosticare la brucellosi nell'uomo e nella specie bovina, permettendo di identificare proteine potenzialmente utilizzabili a scopo vaccinale (34). *S. aureus* è resistente ad alcuni antibiotici ed è responsabile di alcune patologie sia umane che bovine, nonché di patologie di origine alimentare. Grazie all'utilizzo congiunto di tecniche proteomiche e genomiche, sono stati caratterizzati ben 17 ceppi di *S. aureus*, focalizzando l'attenzione sui fattori di virulenza identificati mediante la caratterizzazione del proteoma extracellulare di ciascun ceppo (35). Lo studio ha rivelato differenze nei proteomi extracellulari degli isolati da uomo o da bovino, probabilmente imputabile alla specificità per l'ospite, caratteristica che sottolinea la plasticità del batterio e supporta la teoria seconda la quale ciascun ceppo di *S. aureus* può potenzialmente modificare l'espressione genica trasformandosi in un patogeno (36).

I modelli animali in corso di tossicosi: avvelenamento da rame nella pecora

Il rame, elemento essenziale e cofattore di molti enzimi, può generare specie reattive dell'ossigeno, grazie alla sua capacità di trasferire elettroni. L'omeostasi del rame è finemente regolata e un eventuale suo squilibrio può scatenare nell'uomo alcune patologie, tra cui la cirrosi infantile endemica indiana, tossicosi idiopatica del rame e la cirrosi infantile endemica tirolese (37).

La pecora è caratterizzata da una limitata capacità di espellere il rame nella bile, accumulandolo nel fegato; è quindi particolarmente sensibile all'eccesiva presenza del rame nel cibo, che può portare a una tossicosi epatica. La razza di pecore Ronalsday Nord, particolarmente sensibile all'eccesso di rame, è utilizzata come modello negli studi tossicologici delle patologie epatiche associate all'eccesso di rame (66). Sono stati confrontati mediante elettroforesi bi-dimensionale e spettrometria di massa i profili epatici di due razze con sensibilità differente al rame, la Ronalsday Nord e la Cambridge; l'eccesso di rame determina un aumento della risposta adattativa che mira al mantenimento dell'omeostasi, con aumento delle proteine coinvolte nei processi di detossificazione.

Conclusioni

Il potenziale dell'utilizzo degli animali da allevamento come modelli delle patologie umane è ancora tutto da esplorare.

Da un punto di vista economico e pratico, i roditori rappresentano ancora la prima scelta per gli esperimenti *in vivo*, benché essi presentino numerosi e noti punti deboli (38), il primo dei quali è il gap evolutivo (39). Contestualmente, i tempi di gestazione più lunghi, (112 giorni per i maiali, 150 giorni per i piccoli ruminanti, 280 per i bovini, 336 per i cavalli) e i

conseguenti maggiori costi di allevamento non giocano a favore dell'utilizzo di questi animali nella ricerca, soprattutto se confrontati con i tempi di gestazione del topo (20 giorni). D'altro canto, le analisi proteomiche richiedono spesso un'abbondante quantità di materiale di partenza e una elevata concentrazione di proteine, richieste più facilmente soddisfabili con l'impiego di animali di grandi dimensioni come quelli d'allevamento, per i quali i campioni possono essere prelevati direttamente in sede di macellazione. Non va dimenticato inoltre che le informazioni ottenute possono trovare un riscontro immediato nella medicina veterinaria, e non va tralasciato che l'impiego degli animali da allevamento nella ricerca biomedica è maggiormente accettato rispetto all'impiego di primati o di animali d'affezione.

In conclusione, esiste un'evidente esigenza di ampliare il numero di specie animali utilizzabili come modello per lo studio di patologie umane, dal momento che il numero esiguo delle specie utilizzate fino a ora ha limitato le risposte che questi modelli possono fornire. Considerando l'aumento delle conoscenze per quello che riguarda l'espressione proteica e la diffusione delle tecniche proteomiche anche presso i laboratori di medicina veterinaria e produzioni animali, è prevedibile che si registri un aumento esponenziale nell'utilizzo di animali da reddito come modello per lo studio di malattie umane.

Bibliografia

(1) Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E., Miller, I., Farm animal proteomics--a review. J. Proteomics, 2011,74(3), 282-293.

(2) Elsik, C.G., Tellam, R.L., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., et al., Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. Science 2009, 324(5926),522-528.

(3) Groenen, M.A., Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y. et al., Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. Nature 2012, 491(7424), 393-898.

(4) de Almeida, A.M., Bendixen, E., Pig proteomics: a review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences. J. Proteomics 2012, 75(14), 4296-4314.

(5) Verma, N., Rettenmeier, A.W., Schmitz-Spanke, S., Recent advances in the use of Sus scrofa (pig) as a model system for proteomic studies. Proteomics 2011, 11(4), 776-793.

(6) Rothkötter, H.J., Anatomical particularities of the porcine immune system—a physician's view. Dev. Comp. Immunol. 2009, 33(3), 267-272.

(7) Bjornvad, C.R., Thymann, T., Deutz, N.E., Burrin, D.G., Jensen, S.K. et al., Enteral feeding induces diet-dependent mucosal dysfunction, bacterial proliferation, and necrotizing enterocolitis in preterm pigs on parenteral nutrition. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2008, 295(5), G1092-1103.

(8) Jiang, P., Siggers, J.L., Ngai, H.H., Sit, W.H., Sangild, P.T. et al., The small intestine proteome is changed in preterm pigs developing necrotizing enterocolitis in response to formula feeding. J. Nutr. 2008, 138(10), 1895-1901.

(9) Hang, P., Sangild, P.T., Sit, W.H., Ngai, H.H., Xu, R. et al., Temporal proteomic analysis of intestine developing necrotizing enterocolitis following enteral formula feeding to preterm pigs. J. Proteome Res. 2009, 8(1), 72-81.

(10) Jiang, P., Sangild, P.T., Siggers, R.H., Sit, W.H., Lee, C.L. et al., Bacterial colonization affects the intestinal proteome of preterm pigs susceptible to necrotizing enterocolitis. Neonatology 2011, 99(4), 280-8.

(11) Stephens, A.N., Pereira-Fantini, P.M., Wilson, G., Taylor, R.G., Rainczuk, A. et al., Proteomic analysis of the intestinal adaptation response reveals altered expression of fatty acid binding proteins following massive small bowel resection. J. Proteome Res. 2010, 9(3), 1437-1449.

(12) Zhang, W., Liu, G., Tang, F., Shao, J., Lu, Y. et al., Pre-absorbed immunoproteomics: a novel method for the detection of Streptococcus suis surface proteins. PLoS One, 2011, 6(6), e21234.

(13) Kouki, A., Haataja, S., Loimaranta, V., Pulliainen, A.T., Nilsson, U.J. et al., Identification of a novel streptococcal adhesin P. (SadP) protein recognizing galactosyl-α1-4-galactose-containing glycoconjugates: convergent evolution of bacterial pathogens to binding of the same host receptor. J. Biol. Chem. 2011, 286(45), 38854-38864.

(14) Janvilisri, T., Scaria, J., Teng, C.H., McDonough, S.P., Gleed, R.D. et al., Temporal differential proteomes of Clostridium difficile in the pig ileal-ligated loop model. PLoS One 2012, 7(9), e45608.

(15) Martins, R.P., Collado-Romero, M., Martínez-Gomáriz, M., Carvajal, A., Gil, C. et al., Proteomic analysis of porcine mesenteric lymph-nodes after Salmonella typhimurium infection. J Proteomics 2012, 75(14), 4457-4470.

(16) Bell, L.N., Lee, L., Saxena, R., Bemis, K.G. et al., Serum proteomic analysis of diet-induced steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2010, 298(5), G746-754.

(17) Crick, S.J., Sheppard, M.N., Ho, S.Y., Gebstein, L., Anderson, R.H., Anatomy of the

pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. J. Anat. 1998, 193 (Pt 1), 105-119.
(18) Fert-Bober, J., Sawicki, G., Lopaschuk ,G.D., Cheung, P.Y. Proteomic analysis of cardiac metabolic enzymes in asphyxiated newborn piglets. Mol. Cell. Biochem. 2008, 318(1-2), 13-21.
(19) Yan, L., Vatner, D.E., Kim, S.,J, Ge, H., Masurekar, M. et al., Autophagy in chronically ischemic myocardium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102(39), 13807-13812.
(20) Park, J.Y., Kim, J.H., Choi, Y.J., Hwang, K.C., Cho, S.K. et al., Comparative proteomic analysis of malformed umbilical cords from somatic cell nuclear transfer-derived piglets: implications for early postnatal death. BMC Genomics 2009, 10, 511.
(21) Park, J.Y., Park, M.R., Kwon, D.N., Kang, M.H., Oh, M. et al., Alpha 1,3-galactosyltransferase deficiency in pigs increases sialyltransferase activities that potentially raise non-gal xenoantigenicity. J. Biomed. Biotechnol. 2011, 2011, 560850.
(22) Deeg, C.A., Pompetzki, D., Raith, A.J., Hauck, S.M., Amann, B. et al., Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. Mol. Cell Proteomics 2006 5(8),
(23) Deeg, C.A. A proteomic approach for studying the pathogenesis of spontaneous equine recurrent uveitis (ERU). Vet. Immunol. Immunopathol. 2009, 128(1-3), 132-136.
(24) Zipplies, J.K., Hauck, S.M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M. et al., Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. J. Proteome Res. 2009, 8(2), 992-998.
(25) Chandler, M.J., Smith, P.J., Samuelson, D.A., MacKay, E.O.. Photoreceptor density of the domestic pig retina. Vet Ophthalmol. 1999, 2(3), 179-184.
(26) Azarian, S.M., McLeod, I., Lillo, C., Gibbs, D., Yates, J.R. et al., Proteomic analysis of mature melanosomes from the retinal pigmented epithelium. J. Proteome Res. 2006, 5(3), 521-529.
(27) Chou, C.C., Szczodry, M., Bruno ,S., Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair, Tissue Eng. Part B Rev. 2010, 16(1), 105–115.
(28) Desjardin, C., Balliau, T., Valot, B., Zivy, M., Wimel, L. et al., A method for proteomic analysis of equine subchondral bone and epiphyseal cartilage. Proteomics 2012, 12(11), 1870-1874.

CHINCHILLA LANIGERA, MODELLO ANIMALE PER RICERCHE SULLA FISIOPATOLOGIA, TERAPIA E PREVENZIONE DEI DANNI INDOTTI, SULLA FUNZIONE UDITIVA, DALL'ESPOSIZIONE AI RUMORI

DOMENICO BARONE[1], FRANCO GUARDA[2]

[1] Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino;
[2] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Tassonomia, areale geografico e biologia di *Chinchilla lanigera*

Chinchilla lanigera, roditore sudamericano (Famiglia: *Chinchillidae,* Ordine: R*odentia*), trae i nomi del genere (*Chinchilla* o piccolo *chincha*) e della famiglia, dalla popolazione andina Chincha, mentre quello della specie, "*lanigera",* significa *"provista de una cubierta lanosa"*. Nativi delle Ande peruviane e cilene, estinti in quelle boliviane, i cincilla sopravvivono, dal Perù alla Patagonia, ad altitudini di 3-5000 m.s.l.m., negli *habitat* aridi, rocciosi o sabbiosi, sterili e accidentati dei monti che collegano, da est a ovest, le catene montuose della costa centro-settentrionale del Cile alla parallela catena andina (Fig. 1), inospitali per il clima estremo: le temperature estive diurne arrivano a 30°C all'ombra, quelle notturne scendono a 7°C, mentre, d'inverno, precipitano sotto valori di congelamento. Vivono in tane o in crepe delle rocce e sono agili saltatori. Nell'aspetto e nell'andatura, ricordano i conigli (fig. 2): *Chinchilla lanigera*, detto anche *long-tailed chinchilla*, ha testa grande, padiglioni auricolari arrotondati e prominenti, grandi occhi rossi o scuri, arti anteriori brevi e lunghe zampe posteriori; in cattività, i maschi pesano fino a 600 g e le femmine 800 g, ma, allo stato libero, i due sessi superano di poco i 400-450 g. Il corpo misura circa 25 cm, la coda 13 cm. Sono animali gregari e crepuscolari/ notturni; loro predatori sono i falchi, le puzzole, i felini, i serpenti, le volpi e i canidi, dai quali si difendono con spruzzi di urina; se morsicati, si liberano col brusco distacco della pelliccia dalla cute, senza riportare lesioni cutanee. Erbivori, si nutrono di erbe, foglie, piante, frutti, semi, ma anche di piccoli insetti. Animali gregari, vivono in gruppi sociali - molto rumorosi, con una femmina dominante - di pochi, o fino a 100, o di varie centinaia di individui organizzati in colonie, distribuite su oltre 100 ettari (4-5 cincilla/ettaro). Possono riprodursi in qualunque periodo dell'anno: la gestazione dura 111 g, più che nella maggior parte dei roditori: così, i piccoli (1-5 per parto) nascono precoci, già coperti di pelo, con gli occhi aperti e la dentatura spuntata. Privi di ghiandole sudoripare, dissipano il calore corporeo grazie alla fitta rete di capillari sanguigni nei padiglioni

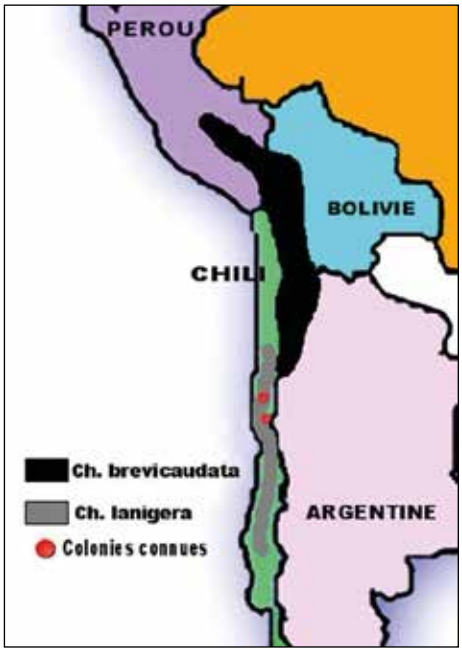


Fig. 1. Areale geografico di *Chinchilla lanigera* (*long tailed chinchilla*) (da: www.newworldencyclopedia.org)

Fig. 2. *Chinchilla lanigera*, detto anche *long-tailed chinchilla* (da: Drs. Foster & Smith Educational Staff)

auricolari: se la temperatura corporea supera i 25°C, rischiano colpi di calore letali (Myers, 2000; Honeycutt, 2004; Spotorno, 2004; Harrington, 2014). Il pelo, lungo 2-4 cm, è molto folto e soffice come velluto: circa 60 peli escono da ogni follicolo pilifero e il colore della pelliccia va dal grigio al bluastro-grigio, al perla, con bandeggiature nere. Il commercio delle pelli di cincilla risale al secolo XVII; nel 1810, il gesuita Juan Ignacio Molina ne ipotizzò l'allevamento, ma solo nel 1900 Frederico Albert riuscì ad allevarli in cattività. Tra il 1895 e il 1900, oltre 2 milioni di pelli furono commercializzate e, nel solo 1905, ben 217.836 cincilla furono soppressi. A inizio '900, la specie *Chinchilla lanigera* era quasi estinta; la prima legge di protezione fu promulgata solo nel 1929. Considerato definitivamente estinto negli anni '50 del secolo scorso, il cincilla fu riscoperto nel 1978 e nel 1983. Oggi, solo 19/42 colonie note sono protette nella *Reserva Nacional Las Chinchillas* (reg. Coquimbo, prov. Choapa), mentre la popolazione di cincilla selvatici, stimata ormai in soli 2500-15.000 esemplari, è in continuo declino e, fino al 2004, nessuna misura protettiva era stata presa per la piccola, ma geneticamente ricca, popolazione di *La Higuera*. I cincilla sono tranquilli, timidi, mordono raramente; prodotti in allevamenti, oltre che per il valore della pelliccia, sono ricercati come animali da compagnia e impiegati nelle ricerche sulla fisiopatologia di affezioni uditive spontanee e indotte dall'ambiente.

Chinchilla lanigera, modello animale nella ricerca audiologica

Nell'uomo si possono indurre, a fini sperimentali, solo modifiche temporanee e totalmente reversibili della funzione uditiva; di qui la necessità di modelli animali per lo studio dei rapporti tra *shift* temporanei (TTS) e permanenti (PTS) della soglia uditiva e lesioni dell'organo del Corti (OC, figg. 3,4), delle relazioni tra la perdita dell'udito indotta dall'esposizione al rumore e l'invecchiamento, delle interazioni tra rumore e altri agenti o dell'efficienza di trattamenti/dispositivi per curare/prevenire traumi acustici.

Il cincilla, per le somiglianze anatomiche e fisio-patologiche che il suo apparato acustico ha con quello umano, è il modello animale di elezione in questo ambito della ricerca biomedica. Orecchio medio, orecchio interno, connessioni nervose di conduzione, gamma della sensibilità uditiva sono anatomicamente e funzionalmente simili alle corrispondenti strutture dell'orecchio umano. Inoltre, orecchio medio e coclea (fig. 3A) sono facilmente accessibili per manipolazioni sperimentali. Dimensioni, assenza di patologie uditive spontanee, longevità, facilità di addestramento a esercizi per la misura dell'udito e il fatto che il cincilla soffre, come l'uomo, di presbiacusia[1], hanno imposto questo animale come modello di patologia nella ricerca audiologica (Bartl, 2008; Martin, 2012).

Sono stati messi a punto vari modelli per lo studio dei danni indotti all'udito dall'esposizione al rumore, della successiva rigenerazione neurale, della morte delle cellule sensoriali causata dall'esposizione al rumore e delle possibili terapie/prevenzioni dell'otite media indotta da patogeni, della perforazione del timpano, del colesteatoma[2], per testare farmaci per uso otico

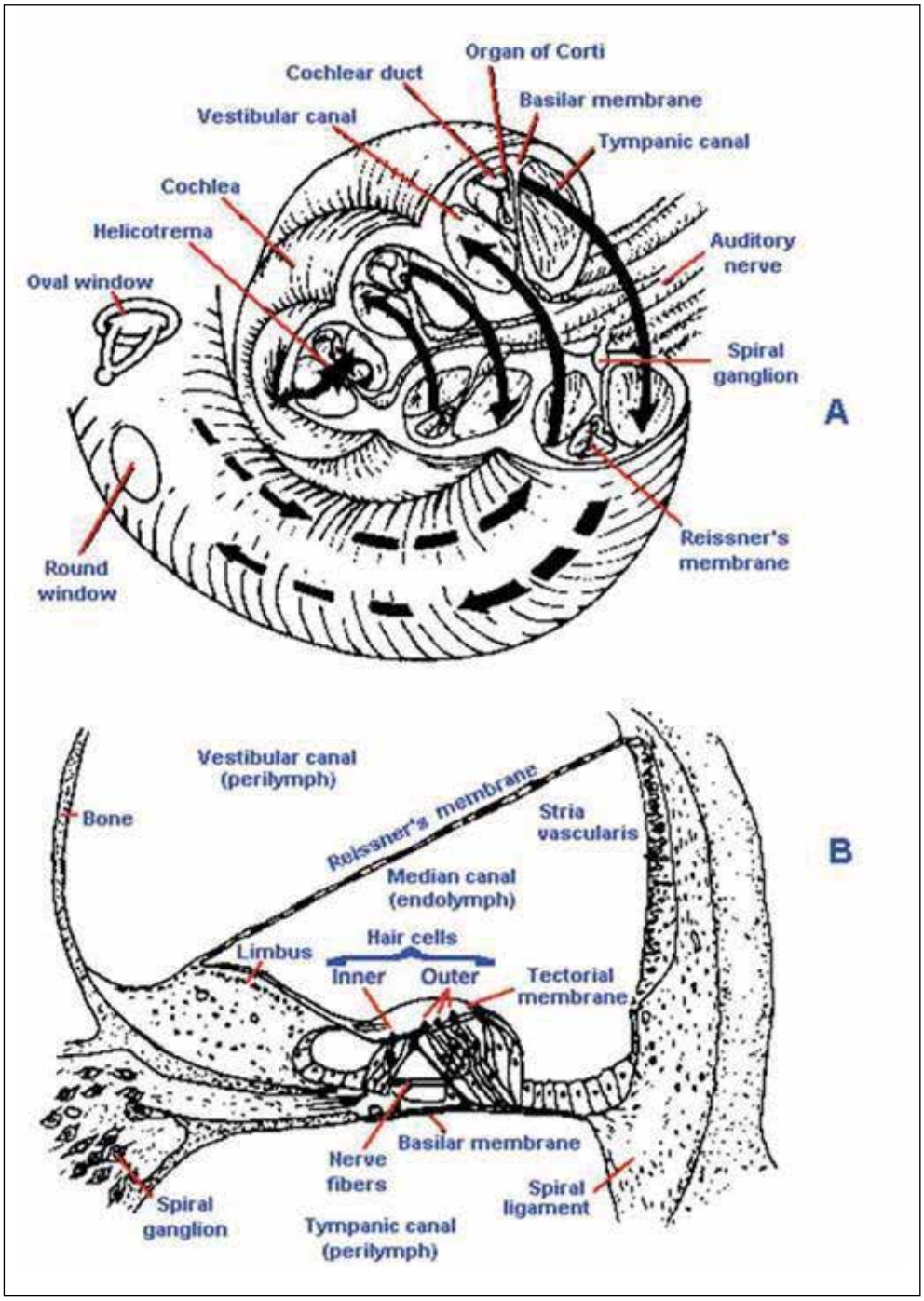


Fig.3A: coclea con organo del Corti (OC) nel canale cocleare. B: sezione trasversale dell'organo del Corti (OC) (da: Wikipedia)

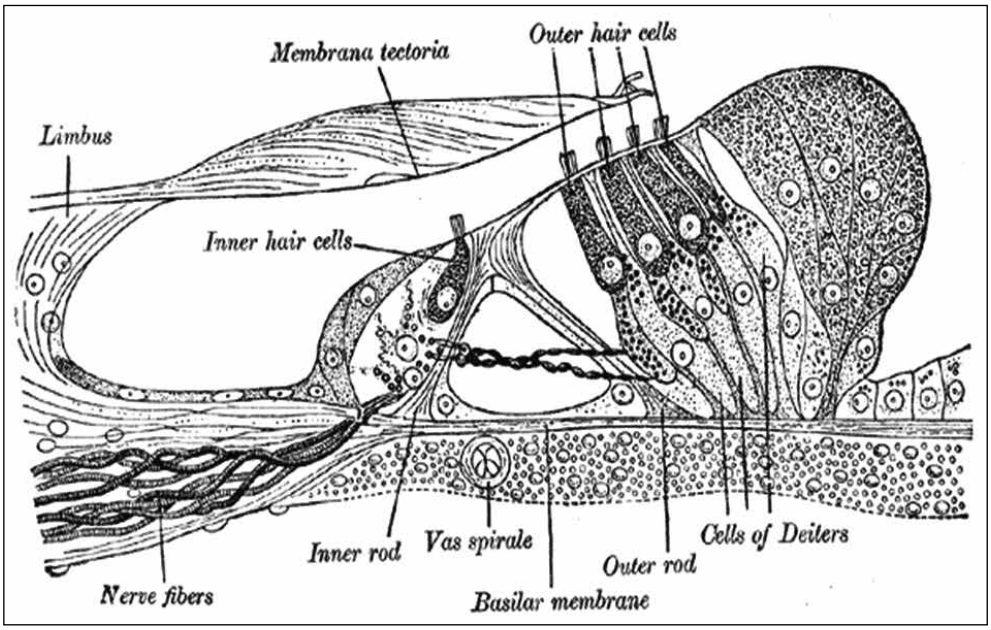


Fig. 4. Organo del Corti con cellule capellute interne ed esterne (da: Wikipedia)

e per studi di farmacocinetica degli antibiotici usati nella terapia delle infezioni dell'orecchio.

Modelli per lo studio della perdita dell'udito coprono anche metodologie per l'induzione chimica e acustica di altre patologie dell'orecchio, come il tinnito, le perforazioni del timpano, gli impianti cocleari, le fistole perilinfatiche e della deiscenza della parete ossea esterna del canale semicircolare superiore dell'apparato vestibolare (sindrome di Minor, 1998) (Martin, 2012).

Il cincilla è tuttora il *gold standard* nelle ricerche sulle patologie uditive, soprattutto in quelle degenerative, e sui processi riparativi, ma si registra, tra i ricercatori, una certa tendenza a scegliere modelli murini (topi CBA, C57BL), in particolare nello studio del ruolo delle alterazioni genetiche e dei fattori ambientali nello sviluppo e progressione della presbiacusia e sulla suscettibilità alla perdita dell'udito indotta dall'esposizione al rumore.

Chinchilla lanigera, modello animale per lo studio dei danni audiologici da esposizione al rumore

In base alla frequenza, intensità e durata dell'esposizione al rumore, l'orecchio dell'animale, come quello umano, va incontro a TTS o PTS. Varie ipotesi sono state formulate sulla patogenesi di questi *shift,* ma nessuna è del tutto convincente.

Fino a pochi anni fa, infatti, il/i meccanismo/i con il/i quale/i l'esposizione al rumore danneggia/distrugge le cellule sensitive, le cellule di supporto e le fibre nervose della coclea (fig. 2A) era/no ignoti e non si sapeva perché l'esposizione al rumore causi la perdita irreversibile delle cellule recettoriali ciliate, o capellute (*hair cells*, HC, figg. 2B,3) che sono nella coclea dell'OC (fig. 2A), né perchè la morte delle HC, nella metà apicale dell'OC, si verifichi seguendo *pattern* differenti dalla metà basale.

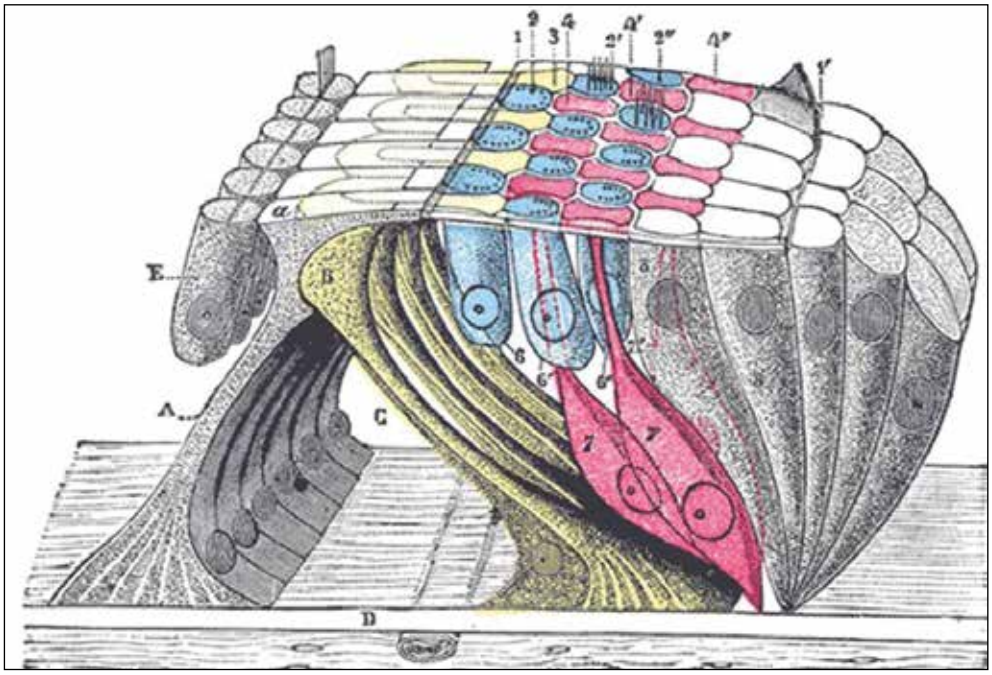


Fig. 5. Sezione dell'organo spirale del Corti: lamina reticolare e strutture adiacenti. A) Pilastri interni e a) la loro parte apicale, B) Pilastri esterni (in giallo), C) Galleria di Corti, D) Membrana basilare, E) Cellule acustiche interne, 1) Bordi interno ed esterno della membrana reticolare, 2) Cuticole delle cellule acustiche esterne (in blu), 3 e 4) Falangi delle cellule di Deiters (in rosso), 6) Cellule acustiche esterne (in blu), 7) Cellule di Deiters (in rosso), 8) Cellule di Hensen e Claudius (da: Wikipedia)

L'assenza di conoscenze sui meccanismi della morte delle HC recettoriali, indotta dal rumore, ha ritardato a lungo l'individuazione di agenti protettivi per prevenire/ridurre/impedire i danni all'udito indotti dal rumore. Le HC recettoriali sensitive (~16.000/orecchio) poggiano sulla membrana basilare che, flessibile, si piega in risposta al suono; si dividono in HC interne (IHC) ed esterne (OHC) (figg. 3B, 4): sono trasduttori meccano-elettrici che trasformano gli impulsi meccanici causati dalle onde sonore, in impulsi elettrici nervosi, tramite passaggio di ioni; danneggiate, non si rigenerano.

Uno studio approfondito ed esaustivo è stato condotto presso il *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH, USA) sui danni temporanei/permanenti indotti dall'esposizione al rumore, e su come questi correlino con le alterazioni strutturali indotte nell'organo dell'udito (Bohna, 2008). Cincilla sono stati studiati funzionalmente, analizzando le risposte uditive evocate dal *brainstem* (tronco cerebrale) (ABR) e le *distortion product otoacoustic emissions* (DPOAE) prima di una, o più volte dopo, esposizione al rumore. Le DPOAE sono generate nella coclea (fig. 3A), in risposta a due toni simultanei di frequenze differenti e al livello di pressione sonora presentato nel canale uditivo e sono indicatori oggettivi del normale funzionamento delle cellule ciliate esterne (OHC) cocleari. Le coclee sono state fissate *in vivo*, incluse in plastica, sezionate, misurate e le HC morte e moribonde contate nell'intera

coclea. Le alterazioni della funzione uditiva, dopo esposizione a rumore di banda di ottava (OBN) di alta (4 kHz) o di bassa frequenza (0,5 kHz), sono state rapportate ai danni strutturali nell'OC. Si è scoperto che, immediatamente dopo l'esposizione a un rumore moderato (*recovery* <3 h), *shift* delle soglie ABR e dei livelli delle DPOAE rispecchiavano una patologia delle cellule di supporto dell'OC e delle HC. Dopo *recovery* da un'esposizione moderata, ABR-PTS (ABR-*permanent threshold shift*) rilevavano perdite focali di HC, a differenza delle DPOAE-PTS, che non possono, quindi, essere usate per monitorare soggetti umani esposti al rumore e per individuare perdite iniziali di HC nella coclea. Iniettando *in vivo,* nello spazio endolinfatico (SEL), una sospensione di particelle traccianti, si è dimostrato che, dopo esposizione a un rumore nocivo, si verifica una temporanea soluzione di continuità nella funzione di barriera della *lamina reticularis* che, con la lamina basale, forma la membrana basilare (figg. 2B,3,4). Questa valutazione è stata fatta rilevando la distribuzione delle particelle traccianti nel SEL e nell'OC, a 0 e 28 giorni dal *recovery*. Quando l'OC era danneggiato dal rumore, al punto che le OHC degeneravano, l'endolinfa contenente le particelle traccianti entrava nell'OC e diffondeva nel fluido dei suoi spazi. La perdita continua di cellule sensoriali OHC, che spesso si verifica in seguito a esposizione al rumore, è causata, in parte, dalla rottura acuta della *lamina reticularis* (fig. 5) e in parte dalla contaminazione dell'endolinfa dell'OC. Questo meccanismo può essere responsabile anche di perdite focali di OHC in zone ristrette dell'OC, dopo esposizione a un OBN di bassa (0,5 kHz) o di alta frequenza (4 kHz), perdite che, nella metà superiore dell'OC, sono distribuite in modo differente dalla metà inferiore.

Il livello di esposizione al rumore fa la differenza nello sviluppo delle lesioni focali delle OHC e/o delle HC interne (IHC). Lesione focale è una regione nella quale il 50%, o più, delle OHC o delle IHC, è perso su un'ablazione di almeno 0,03 mm. Anche i meccanismi di formazione delle lesioni focali di OHC differiscono nelle due metà, apicale e basale, dell'OC, sia durante che dopo l'esposizione al rumore. Inoltre, il/i meccanismo/i della formazione delle lesioni focali delle IHC differisce/ono da quello/i che induce/ono la formazione di lesioni focali delle OHC. Né gli *shift* temporanei della soglia delle ABR (ABR-TS) né gli *shift* dei livelli delle DOPAE (DOPOAE-LS) hanno mostrato differenze consistenti nel tasso di *recovery* col tempo di post-esposizione, tra le orecchie che sviluppavano e quelle che non sviluppavano un PTS. Quindi, l'ipotesi che il *recovery* ritardato dalle ABR-TPS e/o dalle DPOAE-LS potrebbe indicare che l'orecchio aveva un'aumentata suscettibilità al rumore, non ha trovato conferma sperimentale.

Applicando criteri morfologici e trattando *in vivo* con il colorante vitale tripan blu, sono state identificate le *pathway* di morte seguite dalle OHC dopo esposizione a un tipico rumore prodotto su un posto di lavoro (OBN 4 kHz o 0,5-kHz, a un livello di pressione sonora, o acustica (SPL), di 80-95 dB (SPL è la deviazione della pressione locale da quella ambientale, causata da un'onda sonora). I *pattern*, dall'apice alla base dell'OC, della morte delle OHC sono stati determinati 0 e 30 giorni dopo l'esposizione al rumore: sono state confrontate le alterazioni della funzione uditiva con le perdite delle OHC e con altri danni strutturali: alcune OHC, danneggiate dal rumore, avevano un aspetto morfologico diverso dall'apoptosi, dall'oncosi e dall'autofagia. Se confermata, la dimostrazione che questa nuova *pathway* prevale nel controllo della morte delle OHC, a seguito dell'esposizione a un rumore moderato, rivoluzionerà il pensiero sul/i meccanismo/i di base del danno indotto da un rumore moderato e avvalorerà l'orecchio del cincilla come modello animale valido per un nuovo filone di ricerca di farmaci per prevenire, o minimizzare, la morte cellulare indotta dal rumore (Bohne, 2008).

Nella scia di ricerche negli uccelli che hanno mostrato che HC degenerate sono rimpiazzate, talora, da cellule recettoriali rigenerate, si è valutato, nella coclea di cincilla adulti, se HC e fibre nervose possono rigenerarsi. La microscopia a contrasto di fase e quella in campo chiaro di 88 coclee di cincilla, danneggiate dal rumore, non ha mostrato segni di rigenerazio-

ne delle HC. Tuttavia, 32 coclee su 46 (70%) danneggiate da un rumore di alta intensità e 20 coclee su 42 (48%) danneggiate da un rumore di media intensità, presentavano, in numero variabile, fibre nervose rigenerate che, localizzate in aree gravemente danneggiate dell'OC, differivano dalle fibre sopravvissute per diametro, grado e *pattern* di mielinizzazione e per le vie anomale seguite nella lamina spirale ossea e sulla membrana basilare (figg. 3B, 4). Il numero delle fibre rigenerate variava col tipo di esposizione e con la durata del *recovery*. La risposta più intensa è stata rilevata nelle orecchie esposte a rumori di alta intensità e bassa frequenza. Questi risultati dimostrano che l'orecchio interno dei mammiferi possiede un potenziale di riparazione biologica (Bohne, 1992).

Per appurare se il danno indotto dal rumore nell'OC differisce nelle regioni delle basse, da quella delle alte frequenze della coclea, cincilla sono stati esposti, da 2 a 432 giorni, a un OBN di bassa (0,5) o di alta (4 kHz) frequenza, a un SPL di 47-95 dB. Le soglie uditive sono state determinate prima, durante e dopo l'esposizione al rumore. Al microscopio, si sono contate le cellule perse ed è stata determinata la sequenza della degenerazione in funzione del tempo di r*ecovery* (0-30 giorni). Col rumore di alta frequenza, il danno primario si è manifestato inizialmente sotto forma di piccole perdite focali delle OHC nella regione di 4-8 kHz. Con l'esposizione prolungata, il danno è progredito, coinvolgendo la perdita di un intero segmento dell'OC e delle fibre nervose mielinate adiacenti, perdita, quest'ultima, in gran parte secondaria al mescolamento dei fluidi cocleari attraverso la *lamina reticularis* danneggiata. Col rumore di bassa frequenza, il danno primario si è presentato sotto forma di una perdita delle OHC diffusa su un'ampia area nell'apice. Continuando l'esposizione, altre OHC apicali sono degenerate, mentre le cellule di supporto, le IHC e le fibre nervose sono rimaste intatte. Inoltre, si sono riscontrate lesioni focali nella coclea basale, indistinguibili da quelle provocate dall'esposizione al rumore di alta frequenza.

Gli aspetti del danno cocleare e il loro rapporto con misurazioni funzionali dell'udito sono molto simili, nei cincilla esposti al rumore, al quadro repertato nell'uomo esposto a disturbi acustici, confermando che il cincilla è un valido modello sperimentale per lo studio dei danni indotti dall'esposizione al rumore (Bohne, 2000). È stato usato un tracciante *in vivo* per appurare se la *lamina reticularis* (fig. 5), e/o le membrane addossate allo spazio endolinfatico, sono temporaneamente disgregate dopo l'esposizione a un OBN intenso (4 kHz, 108 dB SPL, 1,75 h). Usando una micropipetta a 2 canne, è stato misurato il potenziale endolinfatico (PEL) ed è stata iniettata nello SEL, 0 o 28 giorni dopo l'esposizione al rumore, endolinfa artificiale, contenente il 10% di particelle di carbone. Le coclee, fissate 30-45 min dopo l'iniezione, sono state disidratate, incluse e sezionate in preparazioni piane. Quantificato il danno nell'OC, si è determinata la localizzazione del carbone. Il valore medio del PEL in 5 coclee di controllo, con solo carbone tracciante nello SEL, era 72±5 mV; queste coclee avevano carbone tracciante solo nello spazio endolinfatico. Nel giorno 0, a 3-4 ore dall'esposizione al rumore, 4 cincilla su 5 esposti avevano un basso PEL (30±6 mV) e parecchie lesioni focali, nelle quali quasi tutte le IHC erano appena degenerate. In queste lesioni, il carbone era attaccato alle membrane e a frammenti cellulari, tra la *lamina reticularis* e la lamina basilare. La microscopia elettronica a trasmissione ha evidenziato soluzioni di continuità nelle membrane apicali delle cellule sensitive e di supporto, nel cui citoplasma c'erano particelle di carbone. Al giorno 28, il PEL medio di 4 cincilla esposti su 5 era 70±11 mV e le coclee, prive di tracce di carbone nell'OC, avevano lesioni multiple nella spira basale, rimarginate da cicatrici delle falangi (parte terminale dei pilastri dell'OC, fig. 5) o da cellule epiteliali squamose.

La disgregazione acuta della *lamina reticularis* e delle membrane apicali delle cellule sensoriali e di supporto dovuta al rumore è il principale meccanismo responsabile della degenerazione nella coclea che si diffonde/persiste, per giorni e settimane, dopo l'esposizione al rumore (Ahmad, 2003).

Tre *pathway* di morte delle OHC, negli OC di cincilla esposti a un OBN di livello moderato (0,5 kHz) o alto (4 kHz), sono state identificate in base a criteri morfologici: 1) cellule oncotiche-rigonfie, pallide con nuclei rigonfi, 2) cellule apoptotiche raggrinzite, scure, con nuclei picnotici e 3) un *pathway* di nuova caratterizzazione, di cellule prive della membrana plasmatica basolaterale, ridotte in frammenti cellulari disposti nella forma di un'OHC intatta, con scarso nucleoplasma. Per ridurre al minimo la perdita secondaria di OHC, causata dall'entrata dell'endolinfa nell'OC, le coclee usate per quest'analisi quantitativa delle *pathway* di morte cellulare rispondevano alle seguenti caratteristiche: 1) livello di esposizione al rumore: 95 dB SPL, 2) durata dell'esposizione: 6-216 ore, 3) fissazione *in vivo*, 1-2 ore dopo l'esposizione, per l'esame al microscopio, e 4) assenza di lesioni focali delle OHC nell'OC. Nelle 58 coclee esposte al rumore esaminate, che soddisfacevano questi criteri, le OHC degeneranti/perse venivano classificate in base al *pathway* di morte che le cellule avevano seguito o stavano seguendo. *Pathway* di morte delle OHC sono stati valutati anche in 9 coclee di controllo. Nelle coclee esposte al rumore per energie di esposizione totali maggiori di quelle prodotte da un OBN 75 dB SPL per 216 ore a 0,5 kHz e un OBN 57 dB SPL per 48 ore a 4 kHz, il numero delle OHC che seguivano la 3ª *pathway* di morte è risultato significativamente maggiore rispetto alle coclee non esposte. Nelle coclee esposte ad ambedue gli OBN e fissate 1-2 ore dopo l'esposizione, le OHC moribonde per oncosi o apoptosi erano rarissime, a differenza di quelle che seguivano la 3ª *pathway* di morte cellulare (Bohne, 2007).

Chinchilla lanigera, modello di studio della prevenzione e/terapia dei danni indotti da rumore

Gli effetti della combinazione di due composti antiossidanti sono stati studiati in un modello di cincilla per lo studio della perdita dell'udito da esposizione al rumore. Usando potenziali evocati del *colliculus inferior*[3] (principale nucleo mesencefalico della *pathway* uditiva) si sono ottenute le soglie uditive basali da cincilla che sono poi stati esposti per 6 ore a un OBN centrato a 4 kHz (105 dB SPL) e, un'ora dopo, sono state registrate le soglie post-esposizione. Un gruppo di cincilla ha poi ricevuto soluzione fisiologica (controlli), un altro la combinazione salicilato+*N*-L-acetilcisteina. A un terzo gruppo, la miscela antiossidante è stata somministrata un'ora prima dell'esposizione. L'udito è stato misurato 1, 2 e 3 settimane dopo l'esposizione. Raccolte e fissate le coclee, sono stati preparati i citococleogrammi (analisi morfologica quantitativa delle OHC). Nei controlli, a 3 settimane dall'esposizione al rumore, si è registrato uno *shift* della soglia a 20-40 dB SPL. Nel gruppo pre-trattato, i PTS alla 3ª settimana erano significativamente ($p<0,05$) ridotti a circa 10 dB. I PTS nel gruppo trattato dopo l'esposizione erano simili a quelli del gruppo trattato prima dell'esposizione a 1 e a 2 kHz (0-10 dB), ma era intermedio tra il valore dei controlli e quello dei pre-trattati a 4 e 8 kHz (23 dB): il pre-trattatamento con antiossidanti ha inibito significativamente la perdita di HC, mentre la somministrazione di antiossidanti dopo l'esposizione non ha protetto dalla perdita di HC. Questi risultati dimostrano che è possibile ridurre la perdita dell'udito indotta da rumore, somministrando composti antiossidanti di uso clinico corrente (Kopke, 2000).

Anche il pre-trattamento con D-metionina (D-met) esplica attività otoprotettiva dal danno uditivo indotto dal rumore. A 3 gruppi di cincilla (5/gruppo) sono state somministrate 5 dosi di D-met (200 mg/kg/dose, intraperitoneo) 2, 2,5 o 3 giorni prima dell'esposizione al rumore. Cinque cincilla di controllo hanno ricevuto, per 5 volte, il corrispondente volume del veicolo (fisiologica). Le soglie delle ABR sono state misurate al giorno 0 (linea di base) prima dell'esposizione di 6 ore a un OBN 105 dB SPL, e 1 e 21 giorni dopo. Il conteggio delle OHC è stato fatto dopo il sacrificio, il giorno 21. Gli *shift* della soglia delle ABR dalla linea di base, 21 giorni dopo l'esposizione al rumore, risultavano ridotti, rispetto ai controlli, in

tutti i gruppi trattati con D-met, ma solo nei cincilla del giorno 3 il dato raggiungeva la significatività ($p<0,05$) *vs* i controlli. Nei gruppi D-met la perdita delle OHC era ridotta, rispetto ai controlli, al giorno 21 dopo l'esposizione, raggiungendo la significatività ($p<0,05$), in tutte le regioni di frequenze, nel gruppo del giorno 3 e alle regioni di frequenza 2, 4 e 8 kHz nel gruppo trattato con D-met 2,5 giorni prima dell'esposizione al rumore. D-met, somministrata prima dell'esposizione al rumore, ha protetto in modo significativo dallo *shift* della soglia ABR indotta dal rumore e dalla perdita di OHC (Claussen, 2013).

Modelli animali a confronto ed estrapolazione dei dati all'uomo

I modelli animali più usati nella ricerca audiologica, oltre al cincilla, sono il gatto (*Felis catus*), il gerbillo, il topo, il *guinea-pig* (*Cavia porcellus*) e la scimmia-scoiattolo (*Saimiri sciureus*). La rispettiva suscettibilità intrinseca all'esposizione al rumore può essere più o meno elevata. Questa variabile, insieme alle differenti condizioni sperimentali adottate nei diversi laboratori (ampiezza, spettro e durata dello stimolo acustico, condizioni di esposizione al rumore, intervallo di tempo e tecniche usate, dopo l'esposizione, per misurare la perdita dell'udito) rende difficile il confronto dei risultati ottenuti nelle diverse specie e la loro estrapolazione all'uomo.

TTS e PTS sono stati misurati in 40 gatti, 84 cincilla e 128 *guinea-pig*; circa 200 coclee sono state osservate al microscopio elettronico a scansione. Mentre le coclee dei cincilla e dei *guinea-pig* hanno circa pari suscettibilità all'esposizione al rumore, quelle dei gatti sono risultate più resistenti, con una differenza di ~6 dB nel livello di stimolazione.

Poiché è generalmente accettato che gli spostamenti delle stereociglia si verifichino all'inizio dei danni uditivi, si sono studiati gli eventi meccanici cocleari che potrebbero spiegare le differenze della suscettibilità al rumore nelle diverse specie. Gli spostamenti angolari delle stereociglia sono stati valutati in funzione dello spostamento della membrana basilare (Figg. 2B,3) per 3 frequenze caratteristiche: 1, 4 e 16 kHz. Le stereociglia più corte della prima fila delle OHC vanno incontro ad uno spostamento angolare maggiore e, per un dato *input* alla coclea, i loro spostamenti angolari sono simili nel cincilla e nel *guinea-pig*, ma sono circa due volte minori nel gatto. Si ritiene che i danni a carico delle stereociglia si verifichino in base ad un processo di collasso da affaticamento: l'ampiezza e la frequenza dello stimolo e il numero dei cicli cui sono state esposte le stereociglia sarebbero fattori rilevanti nel favorire lo stress, il quale dipende, in modo non lineare, dal numero dei cicli subiti. Le condizioni alle quali lo stimolo acustico è trasferito dal campo aperto all'orecchio interno sono responsabili della maggior parte delle differenze nella suscettibilità uditiva tra le specie.

Fattori cocleari di origine meccanica potrebbero spiegare, in parte, la maggior resistenza osservata in alcune specie. I risultati di questi studi sono di importanza assoluta, quando si vogliano estrapolare all'uomo misurazioni di perdite dell'udito indotte dal rumore effettuate nell'animale e per accrescere utilità e predittività dei modelli animali (Dancer, 1995).

Note

Nota 1. Presbiacusia (dal Greco *presbys* "anziano" + *akousis* "udire"), o sordità legata all'età, è la diminuzione dell'udito per effetto dell'invecchiamento. Si tratta di un'ipoacusia neurosensoriale progressiva bilaterale e simmetrica correlata all'avanzamento dell'età. L'ipoacusia è inizialmente più accentuata nei confronti delle frequenze più elevate. La perdita dell'udito che si accumula con l'età, ma che è causata da fattori diversi rispetto al normale invecchiamento, non è presbiacusia, anche se può essere difficile differenziare gli effetti individuali di molteplici cause sulla perdita dell'udito. Ci sono quattro tipi patologici di presbiacusia: 1) sensoriale: caratterizzata da degenerazione dell'organo del Corti; 2) neurale: caratterizzato da degenerazione delle cellule del ganglio spirale; 3) striale/metabolica: caratterizzata da atrofia della *stria vascularis* in tutti i giri della coclea; 4) cocleare-conduttiva: dovuta a irrigidimento della membrana basilare della coclea che influenza così il suo movimento.

Nota 2. Colesteatoma è un tumore benigno di aspetto squamoso ed espanso (epitelio malpighiano cheratinizzato e desquamante), che si forma durante l'otite media cronica colesteatomatosa. Questa forma di otite è caratterizzata sempre da perforazione del timpano, localizzata a livello Mesotimpanico A, Epitimpanico B o Misto A/B.

Nota 3. C*olliculus inferior* è il principale nucleo mesencefalico della *pathway* uditiva e riceve input da vari nuclei periferici del tronco cerebrale nella pathway uditiva e input dalla corteccia uditiva.

Bibliografia

- Ahmad, M., Bohne, B. A., Harding, G. W., 2003; An in vivo trace study of noise-induced damage to the reticular lamina. Hear Res., vol. 175: pp. 82-100
- Bartl, J., 2008, Chinchilla, 2008; Munich, Germany: GU Verlag Gmbh: ISBN 978-3-8338-1165-4
- Bohne, B.A., 1992; Neural regeneration in the noise-damaged chinchilla coclea. Laryngoscope, vol. 102: pp. 693-703
- Bohne, B.A., Harding, G. W., 2000; Degeneration in the coclea after noise damage:
- primary versus secondary events. Am. J. Otol, vol. 21: pp. 505-509
- Bohne, B. A., Harding, G. W., Lee, S. C., 2007; Death pathways in noise-damaged outer Hair cells. Hear Res., vol. 223: pp. 61-70
- Bohne, B. A., and Harding, G. W., 2008; Adverse effects of noise on hearing: basic mechanisms, NIOSHTIC No. 20041556, R01-OH- 003973: pp. 1-22
- Claussen, A. D., Fox, D. J., You, X. C., Meech, R.P., Verhulst, S. J., Hargrove, T. L., Campbell, K. C. M., 2013; D-methionine pre-loading reduces both noise-induced permanent threshold shift and outer cell loss in the chinchilla, Int. J. Audiol., vol. 52: pp.801-807
- Dancer, A. L., 1995; Use of animal models in the study of the effects of noise on hearing. Occupational Medicine: State of the Art Reviews, vol. 10: pp. 535-544
- Harrington, M., 2014; All ears. Laboratory Animal Europe, vol. 14: p. 32
- Honeycutt, R. L., 2004; Vischachas and chinchillas, in Grzimek's Animal Life Encyclopedia (eds. B. Grzimek, D. G. Kleiman, V. Geist and M. C. McDade), vol. 16: pp. 377-384, Detroit:Thomas-Gale. ISBN 0787657921
- Kopke, R. D., 2000; Reduction of noiseinduced hearing loss using L-NAC and salycilate in the chinchilla. Hearing Res., vol. 149: pp. 138-146
- Martin, L., Chinchillas as experimental models in: The Laboratory rabbit, Guinea pig, Hamster and Other Rodents. Chapter 43, pp. 1009-1028, 2012; Eds Suckow, M. A., Stevens, K. A., & Wilson R. P.; (Academic, San Diego)
- Myers, P., Chinchillidae, 2000; (http://animaldiversity: ummz. umich.edu/site/ accounts/information/Chinchillidae.html) Animal Diversity Web
- Spotorno, A. E., Zuleta, c.a., Valladares, J. P., Deane, A.L., and Jiménez, J. E., Chinchilla laniger; Mammalian Species, vol. 758: pp. 1-9, Published by The Americam Society of Mammologists, 2004

ARBACIA PUNCTULATA, PARACENTROTUS LIVIDUS E ALTRI RICCI MARINI, MODELLI ANIMALI IN FARMACO-TOSSICOLOGIA, TERATOGENESI ED ECO-TOSSICOLOGIA MARINA

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Arbacia punctulata (fig. 1) e altri echinodermi sono modelli animali particolarmente adatti alle ricerche sulla fertilizzazione delle uova, sulla chemotassi e sullo sviluppo embrionale. Quest'ultimo è uno dei pochi modelli animali, selezionati e perfezionati in un oltre un secolo di ricerche dai biologi dello sviluppo, utilizzati nella ricerca di base e in quella applicata: la semplicità dell'organizzazione dell'embrione permette di seguire le interazioni tra le cellule durante tutto il processo embrionale - dall'oocita fecondato, allo stadio di pluteo, alla post-metamorfosi - e permette di seguire le interazioni tra le cellule che portano allo sviluppo dell'embrione, usando un semplice stereomicroscopio, senza dover ricorrere a metodi invasivi.

Una delle caratteristiche più importanti degli embrioni di *Arbacia punctulata,* come modello animale è la disponibilità di grandi quantità di materiale omogeneo che facilita approcci biochimici e di biologia molecolare. La facilità di manipolazione dei gameti permette analisi dettagliate dei meccanismi della fertilizzazione, della chemotassi e degli eventi biochimici a carico degli spermatozoi prima della fecondazione, mentre la trasparenza e la sincronizzazione delle uova fertilizzate facilitano ricerche sulla divisione e sul ciclo cellulare. Inoltre, gli embrioni di *Arbacia punctulata,* e dei ricci di mare in generale, rappresentano un sistema modello ideale per lo studio della trasduzione del segnale, perché il numero delle cellule che li costituiscono è piccolo. Infine, la semplicità dell'organizzazione embrionale facilita l'esame dei movimenti morfogenetici e, sia le cellule mesenchimali primarie sia quelle secondarie, rappresentano popolazioni interessanti per lo studio dei movimenti cellulari (Kominami, 2008).

Tuttavia, la scelta degli oociti di *Arbacia punctulata,* e dei ricci di mare come *test system*, trova alcuni limiti insiti nelle caratteristiche proprie del modello stesso. Uno è la breve stagione dell'accoppiamento: oociti maturi e fertilizzati che hanno completato la meiosi non si possono ottenere da un'unica specie durante tutto l'anno. Si è quindi costretti a usare in laboratorio due o tre specie di ricci di mare, con differenti stagioni di accoppiamento. Inoltre, non è stato ancora possibile mettere a punto metodi per ottenere ricci marini mutanti (transgenici e knock-out) per studiarne le funzioni geniche, in quanto è difficile allevare soggetti giovani metamorfosati. La micromanipolazione è uno strumento importante per lo studio degli stadi precoci dello sviluppo:

Fig. 1. *Arbacia punctulata* (da: echinoderms.myspecies.info)

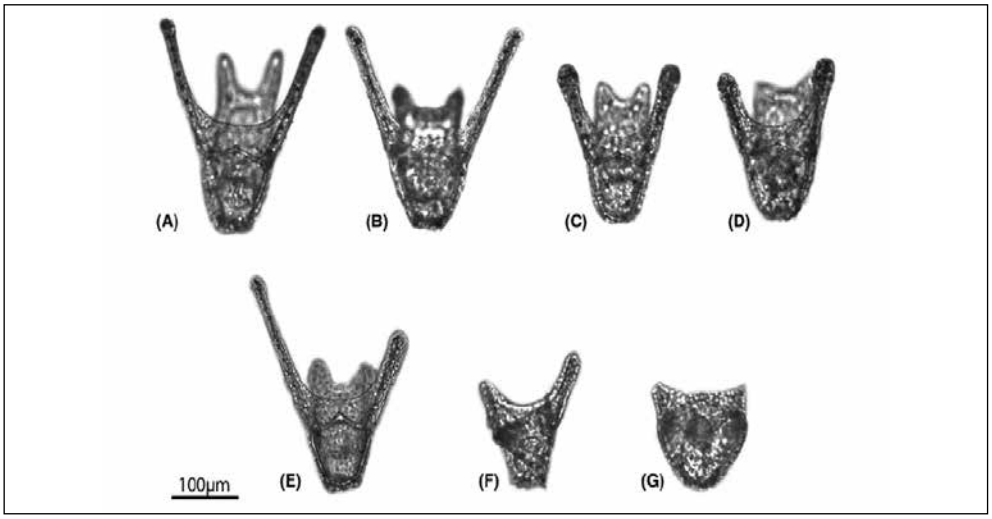


Fig. 2. Echinopluteo (larva planctonica) di *Arbacia*: braccia ben sviluppate, solo qualche lieve asimmetria (A-D); braccia sottosviluppate, asimmetrie pronunciate, arresto dello sviluppo delle braccia (E, F) e arresto dello sviluppo (G) (da: Uthicke *et al*., Mar. Biol. (2013) 160:1913-1926)

le dimensioni dell'embrione sono un fattore critico, e il diametro degli oociti di *Arbacia è* circa 80÷100 µm (Kominami, 2008).

Ci limiteremo qui a riportare i risultati ottenuti con alcuni modelli sperimentali, basati sui ricci di mare *Arbacia punctulata*, *Paracentrotus lividus, Strongylocentrotus purpuratus* e *Lytechinus anamesus*, come *test system* in farmaco-tossicologia e in eco-tossicologia marina.

Arbacia punctulata, modello animale in farmaco-tossicologia e teratogenesi

I ricci di mare sono ottimi indicatori di contaminazione ambientale grazie al fatto che i loro spermatozoi, embrioni e larve sono molto sensibili ai prodotti chimici inorganici e organici e alle tossine presenti in ecosistemi acquatici. Inoltre, gli oociti, gli spermatozoi e gli embrioni di questi echinodermi sono eccellenti modelli animali a scopo di ricerca, in quanto la deposizione delle uova e la raccolta dei gameti sono relativamente semplici, la letteratura sullo sviluppo embrionale degli echinoidei è molto ricca, le larve si sviluppano rapidamente, i soggetti adulti sono disponibili du-

Fig. 3. *Paracentrotus lividus* (da: sapere.it)

Fig. 4. *Ampelisca araucana*

Fig. 5. *Oryzias latipes* (Medaka) (da: Wikipedia)

Fig. 6. *Arbacia spatuligera* (da: www.panoramio.com)

Fig. 7. Larva di echinoderma alla stadio di pluteo al microscopio ottico, 40 ore circa dopo la fecondazione (da: Wikipedia)

rante lunghi periodi dell'anno e si possono facilmente mantenere nelle condizioni di laboratorio.

Arbacia punctulata è facilmente reperibile e la documentazione sugli stadi precoci del suo sviluppo embrionale è abbondante, mentre i metodi di tossicologia embrionale che usano gli embrioni, di questo e di altri ricci marini, consolidati e validati da un impiego che, in alcuni casi, risale a un secolo fa, sono approvati dall'*Environmental Protection Agency* (EPA, USA).

Gli effetti tossici di metalli pesanti, botulini, molecole inorganiche, organiche e tossine ambientali sono stati monitorati sugli embrioni di *Arbacia punctualata*. Bio-accumulo, sviluppo e tossicità embrionale e, più direttamente, genotossicità e mutazioni geniche rappresenta-

no le principali aree di interesse scientifico e di preoccupazione riguardo queste tossine, che possono avere effetti devastanti sugli embrioni: ad esempio, concentrazioni di 250 mg Pb L^{-1}, possono causare l'accumulo di 3 mg Pb g^{-1} di peso secco. Usando, come sistema di dosaggio biologico, un omogenato di oociti non fertilizzati di *Arbacia* e bloccanti dei recettori della rianodina[1],ad esempio, si e scoperto che la sfingosina[2] può attivare il recettore della rianodina[3], che induce un rilascio transiente di Ca^{2+} da depositi intracellulari sensibili alla tapsigargina[4]. La fertilizzazione delle uova di questo riccio di mare rappresenta un modello ideale per lo studio della *pathway* di segnalazione intracellulare di rilascio del Ca^{2+}**,** mentre altre attività cellulari sono i *target* di varie ricerche farmaco-tossicologiche.

Il riconoscimento *self/non-self* negli invertebrati varia da specie a specie e, finora, non si è ancora pervenuti a una comprensione generalmente condivisa della variabilità all'interno di questo *phylum*.

L'iniezione *in vivo* di cellule di *Arbacia*, al 50% intensamente pigmentate, in *Asterias* è seguita da un brusco calo nel numero degli amebociti circolanti (cellule mobili di molti invertebrati, capaci di spostarsi fra i tessuti e di fagocitare corpi estranei o sostanze alimentari) dell'ospite. Le cellule di *Arbacia*, dopo aver aderito agli amebociti di *Asterias* (stella marina), sono state fagocitate dalle cellule di quest'ultima, che si sono aggregate all'interno della papula[5], struttura con funzione respiratoria e poi, frantumate, sono state riversate all'esterno. L'interazione tra gli amebociti di *Asterias* e quelli di *Arbacia* non è prevenuta né dal trattamento dell'ospite *Asterias,* né dal pre-trattamento *in vitro* delle cellule di *Arbacia*, con N-etilmaleinimide (reagente chimico che modifica le proteine). Al contrario, l'iniezione di cellule di un'*Asterias* in un'altra *Asterias* non suscita aggregazione delle cellule dell'*Asterias* donatrice e non è seguita dal calo degli amebociti circolanti dell'*Asterias* ricevente (Reinisch, 1971).

Blastule di riccio di mare sono state trattate con un ossidante sulfidrilico, loperamide-HCl, 0,54 o 0,72 mM, dopo la schiusa delle uova. Come è stato dimostrato, determinando quantitativamente l'incorporazione di ^{35}S-metionina in polipeptidi separati con elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide (2D PAGE), il trattamento con loperamide-HCl ha aumentato la sintesi di un gruppo di proteine embrionali, mentre ha diminuito quella di altre proteine. Questi *shift* sono concentrazione-dipendenti e chiaramente reversibili, dopo che gli embrioni hanno rigenerato i sulfidrili ridotti. Le proteine che hanno mostrato un aumento di incorporazione di ^{35}S-metionina sono migrate, con la 2D PAGE, nella stessa posizione delle *heat shock proteins*[6], e questo risultato fa pensare che loperamide abbia indotto una risposta allo stress. Loperamide ha anche indotto alcune aberrazioni di bassa frequenza dello sviluppo embrionale e ha inibito, in modo reversibile, il battito ciliare (Maglott, 1984).

Estus *et al*. hano pubblicato, nel 1984 e nel 1987, due lavori sulla suscettibilità dell'embriogenesi dei ricci di mare alla tossicità dello sviluppo indotta da fenitoina (difenilidantoina, DFI, antiepilettico, efficace contro le crisi clonico-toniche). Il potenziale teratogeno di questo farmaco è stato quantificato con *score* sotto forma di anomalie nella divisione cellulare, di prematura rottura della membrana ialina, di mancata schiusa delle uova, di assenza di mobilita e/o mancato sviluppo scheletrico. DFI ha indotto teratogenesi dose-dipendente nel *range* di concentrazioni 1-150 μg/mL, con ED_{50} = 20 μg/mL, dello stesso ordine di grandezza dei livelli serici di pazienti in terapia con DFI. Effetti avversi sono comparsi precocemente, già alla prima divisione cellulare. Esperimenti di *wash out* hanno indicato un periodo critico che va dai 45 minuti dopo la fertilizzazione fino all'inizio della gastrulazione, con massima sensibilità tra i 60 e i 90 minuti post-fertilizzazione.

Per valutare l'eventuale ruolo di intermedi epossidici reattivi o di radicali di O_2 nella teratogenesi indotta da DFI, sono stati studiati gli effetti modulatori di α-naftoflavone, metirapone[7], aminotriazolo, ossidi di stirene, di cicloesene e di tricloropropene, della catalasi e della superossido dismutasi: tutti questi trattamenti sono risultati privi di effetti teratogeni. La

teratogenesi indotta da DFI potrebbe essere mediata da sue interazioni dirette col DNA. Per chiarire questa ipotesi, sono stati esaminati i requisiti strutturali di DFI, necessari per indurre teratogenesi. Idantoina[8] (H), O-H, alchil-OH e 3-N-metil-DFI non sono risultate teratogene a concentrazioni fino a 150 μg/mL, suggerendo che 2 gruppi O e un H-ring libero siano necessari affinché DFI induca teratogenesi.

Infine, è stata stabilita una correlazione tra gli effetti elettronici dei sostituenti nell'O di DFI, quantizzati secondo l'equazione di Hammett[9]. Il *rank order* della potenza teratogena degli analoghi di DFI è risultata essere: 5-p-metossi-O-5-OH < 5-p-metil-O-5-OH ≤ DFI. Gli analoghi 5-p-OH-O-5-OH e p-OH-p-metil-DFI sono risultati privi di effetti teratogeni, a concentrazioni fino a 150 μg/mL (Estus *et al*., 1984).

Nel secondo lavoro di Estus e Blumer, è stato approfondito lo studio sulla suscettibilità degli embrioni di *Arbacia punctulata* alla tossicità dello sviluppo indotta da DFI. Sono stati valutati effetti concentrazione-dipendenti, esponendo gli embrioni dal momento della fertilizzazione fino alla gastrula/stadio di prisma[10], attribuendo valori di *score* alle anomalie dello sviluppo rilevate all'esame al microscopio ottico. Malformazioni sono state osservate già alla prima segmentazione, che si presentava asimmetrica, incompleta e bloccata, e anche allo stadio di prisma (fig. 2). Questi effetti erano concentrazione-dipendenti, con EC_{50} ~40 μM, sia nello stadio di segmentazione sia in quello di prisma. Sono stati identificati vari analoghi della DFI, capaci di indurre effetti teratogeni di varia gravità. Il confronto tra l'*uptake* di DFI e quello di un suo analogo non teratogeno, da parte dello zigote, ha dimostrato che l'assenza di teratogenicità del secondo non è dovuta a un suo minore *uptake*, in quanto l'analogo ha raggiunto concentrazioni intracellulari sufficienti a indurre anomalie dello sviluppo, se avesse avuto un'attività intrinseca endocellulare pari a quella della DFI. Sono anche stati individuati i momenti critici, nell'embriogenesi di *Arbacia*, suscettibili all'azione di DFI: gli embrioni sono stati esposti a DFI 120 μM per periodi di tempo intervallati, e lo sviluppo è stato valutato con *score*, a partire dalla fertilizzazione dell'oocita fino allo stadio di prisma. Il periodo critico compreso tra la segmentazione e la morula (0-64 cellule/embrione, 0-5 ore dopo la fertilizzazione) è risultato essere di eccezionale suscettibilità. L'esposizione dell'embrione alla DFI dopo questo periodo non ne ha alterato lo sviluppo. L'esame delle fasi del ciclo cellulare, per individuare quella/e più suscettibile/i agli effetti della DFI sulla divisione cellulare, ha evidenziato che l'esposizione al farmaco, confinata alla fase M (mitosi) del ciclo cellulare, è necessaria e sufficiente per indurre effetti teratogeni. L'entità dell'*uptake* di DFI è stata simile durante gli stadi di sviluppo sensibili e insensibili alla DFI e durante le fasi del ciclo cellulare: non può, quindi, essere considerata responsabile delle variazioni osservate di suscettibilità alla DFI, permettendo di concludere che gli effetti diretti di DFI sull'embriogenesi di *Arbacia* sono confinati alla fase M del ciclo cellulare (mitosi) e allo stadio di morula dello sviluppo embrionale (Estus e Blumer, 1989).

Arbacia punctulata e altri modelli animali in eco-tossicologia marina

Il crescente allarme internazionale riguardo la contaminazione nucleare ambientale delle zone di pesca marine e delle risorse costiere ha attratto l'attenzione e l'interesse scientifico di ecologisti, biologi marini e operatori del settore. Sono pochi gli studi sugli effetti dei raggi X, presenti nelle emissioni di radionuclidi, sullo sviluppo embrionale e sull'espressione genica.

Anche in questa nicchia della ricerca ambientale ed eco-tossicologica, i ricci di mare stanno imponendosi come modelli animali di riferimento. L'esposizione ai raggi X influenza sviluppo ed espressione genica negli embrioni di *Paracentrotus lividus* (fig. 3), riccio di mare del Mediterraneo.

Embrioni in segmentazione sono stati esposti a dosi di 0,1÷5,0 Gy[11], usando una sorgente di Ag di radiazioni X. E stato riscontrato un aumento dose-correlato nel ritardo dello sviluppo e gravi difetti morfologici in embrioni esaminati al microscopio, 24 e 48 ore dopo l'irradia-

zione. In analogia con il classici parametri dei test tossicologici, sono state determinate: *No Observed Effect Dose* (0,1 Gy), *Lowest Observed Effect Dose* (0,5 Gy) e la ED_{50} (1 Gy). Le malformazioni più gravi riguardavano differenziamento e sviluppo dell'intestino primitivo e dello scheletro: gli embrioni esposti ai raggi X erano privi di intestino e di braccia o, queste ultime, erano poco e/o anormalmente sviluppate. E' stata riscontrata anche una riduzione, dose-dipendente, dell'mRNA codificato da due geni specifici dello scheletro, *Pl*-SM30, che codifica per la proteina *spicule matrix SM30*[12]), e *Pl*-msp130 (*mesenchyme-specific cell surface glycoprotein*, che codifica per la *matrix spicule protein* 130), misurate, rispettivamente, con RT-PCR semi-quantitativa e *whole mount in situ hybridization*[13]. Concludendo, l'embrione di *Paracentrotus lividus* (riccio marino del Mediterraneo) è un bio-indicatore sensibile alle radiazioni X e può essere usato come modello animale, alternativo all'uso di animali più sviluppati filogeneticamente, nelle ricerche finalizzate alla protezione della salute dell'ecosistema dagli effetti dei radionuclidi.

Ricercatori dello stesso gruppo, usando embrioni di *Paracentrotus lividus*, modello animale molto usato in ricerche sulla biologia dello sviluppo e in eco-tossicologia, hanno studiato l'espressione di *stress* e *anti-apoptotic proteins,* suscitata in risposta all'esposizione a radiazioni ionizzanti nocive. Sono stati analizzati, con *Western blotting*, gli effetti acuti indotti in embrioni di questo riccio dall'esposizione a una dose elevata (5 Gy) di raggi X: accumulo di HSP60, HSP70, di BAG3[14] e di una *putative* p63 *protein*, 24 e 48 ore dopo l'irradiazione. I risultati indicano aumenti di HSP70, BAG3 e della proteina p63 solo 48 ore dopo l'irradiazione, mentre HSP60 non è mai risultata aumentata. I livelli di mRNA codificanti per HSP70 e p63, determinati con RT-PCR relativa, sono risultati aumentati 24 ore dopo l'irradiazione, ma sono tornati ai livelli iniziali 48 ore dopo l'esposizione ai raggi X. Questi risultati indicano la presenza di un meccanismo regolatorio adattativo, operante a livello trascrizionale a 24 ore dall'esposizione ai raggi X, seguito da un'attivazione traslazionale, 48 ore dopo l'irradiazione. In conclusione, l'embrione di *Paracentrotus lividus* si conferma bioindicatore sensibile ai danni cellulari, tanto che il suo uso è consigliato in studi sulle *pathway* protettive attivate in risposta ai raggi X.

Questi risultati, originali e innovativi, sul coinvolgimento di BAG3 e p63 nella risposta ai raggi X, aprono la strada al loro impiego come *biomarker* dei danni da esposizione a radiazioni X (Bonaventura, 2011).

Le diatomee sono produttori primari ubiquitari e abbondanti, tradizionalmente considerati fonte di cibo per molte specie della fauna marina e per il trasferimento del carbonio attraverso la catena alimentare. Tuttavia, diatomee di molte specie producono aldeidi poli-insature che agiscono da interferenti endocrini dello sviluppo della prole delle specie marine che si nutrono di queste alghe unicellulari.

Dopo trattamento con aldeide poli-insatura decadienale[15], la produzione di nitrossido (NO), messaggero fisiologico, aumenta negli embrioni di *Paracentrotus lividus*, provocando la morte delle cellule proliferanti indifferenziate, quali sono appunto quelle degli embrioni dei ricci marini. A elevate concentrazioni dell'aldeide, il NO media gli eventi apoptotici iniziali, che portano alla perdita della funzionalità mitocondriale, tramite la produzione di $O{=}N\text{-}O\text{-}O^-$ (perossinitrito). A basse concentrazioni dell'aldeide, il NO contribuisce all'attivazione del gene *hsp70*, che codifica per la proteina HSP70, proteggendo, così, gli embrioni dagli effetti tossici dell'aldeide. Abbassando i livelli di NO, tramite inibizione della nitrossido sintetasi, l'espressione di *hsp70* nelle blastule nuotanti scende e la proporzione dei plutei anormali aumenta. Tuttavia, negli stadi tardivi di pluteo (foto 6), NO non è più in grado di esercitare la sua azione protettiva: l'espressione di *hsp70* e della nitrossido sintetasi diminuisce con conseguente aumento dell'espressione della caspasi-8, proteasi che partecipa alle reazioni che iniziano, e portano a compimento, la risposta di morte cellulare programmata (apoptosi).

La scoperta che la produzione di NO aumenta rapidamente, in risposta a uno stimolo tossico esogeno, apre nuove prospettive sul possibile ruolo di questo gas come importante messaggero allo stress ambientale nei ricci di mare e nella comprensione dei meccanismi cellulari sottesi alla tossicità registrata durante la fioritura delle diatomee (Romano, 2011),

A causa delle sue caratteristiche geografiche, l'area (84.000 km^2) dei canali e dei fiordi australi del sud del Cile è sottoposta a una crescente pressione ambientale causata dallo sviluppo di varie forme di acquacoltura (pesci, alghe, molluschi e crostacei). Sostanze si accumulano nei sedimenti come in una vasca naturale e i test eco-tossicologici devono essere sensibili e robusti per effettuare analisi affidabili sul potenziale tossicologico delle sostanze accumulate nei sedimenti.

Allo scopo di fissare una linea base di tossicità di medio livello, è stata allestita una batteria di test eco-tossicologici non specifici per i sedimenti di questa regione. Ventotto campioni di sedimenti marini sono stati raccolti nei canali e nei fiordi studiati durante la crociera CIMAR-Fiordos 11 (luglio 2005). La tossicità dei sedimenti è stata valutata usando, come modelli animali, specie endemiche del Pacifico sud-orientale: *Ampelisca araucana* (Anfipode, crostaceo) (fig. 4), *Tisbe longicornis* (Copepode arpacticoide epibentico), *Arbacia spatuligera* (Echinoderma, riccio di mare) (fig. 5) e *Dunaliella tertiolecta* (Cloroficea, alga verde). Tra queste quattro *test system*, solo le *Dunaliella* esposte ai sedimenti hanno riportato alterazioni significative a carico della crescita, rispetto a quelle del controllo negativo, effetti tossici imputabili all'arricchimento nutritivo delle acque marine. Concludendo, sebbene si siano verificati cambiamenti locali nei sedimenti, l'entità della mesoscala delle alterazioni eco-tossicologiche è risultata bassa, tale, tuttavia, da suggerire la programmazione di un piano di sorveglianza che esegua un monitoraggio dei cambiamenti che si stanno verificando negli *habitat* degli ecosistemi biologici oceanici e di *follow-up* in scale più ampie di tempo e di spazio (Rudolph, 2009).

Stranamente, i lavori di ricerca fatti per determinare il/gli effetto/i tossico/i dell'ipoclorito di sodio (NaOCl) sullo sviluppo embrionale di riccio di mare sono relativamente pochi. NaOCl (candeggina), comunemente reperibile negli scarichi domestici, trova un vasto impiego nella ricerca scientifica biomedica, in particolare in medicina e, soprattutto, nel trattamento dei liquami fognari, dove è usato per abbattere la carica batterica presente negli effluenti dai depuratori. NaOCl può agire da tossina ambientale.

Grazie alla sua elevata sensibilità agli inquinanti ambientali, *Arbacia punctulata* è il modello animale di elezione in studi di embriotossicità sugli effetti di NaOCl. Testando range di concentrazioni di NaOCl che riproducono quelli trovati nelle acque reflue trattate (0,11, 0,06 e 0,03 ppm) sono stati riscontrati minimi effetti sullo sviluppo larvale precoce, sebbene molte larve, esposte alle concentrazioni più elevate di NaOCl, abbiano impiegato più tempo a svilupparsi. E' stata rilevata una differenza significativa ($p=0,038$) nella percentuale di plutei (larva planctonica degli echinoidi (echinopluteo)) anormali e una significativa ($p=0,0027$) interazione tra la percentuale di comparsa di ogni morfologia alterata e la corrispondente concentrazione di NaOCl. L'alterazione più significativa ($p=0,001$) riscontrata nei plutei anormali è stato il ritardo dello sviluppo scheletrico (aste scheletriche accorciate), malformazione la cui frequenza è aumentata con la concentrazione di NaOCl ($p<0,001$). Inoltre, al crescere della concentrazione di questo contaminante, si è registrata una significativa ($p=0,05$) riduzione della lunghezza dello scheletro sia nei plutei con sviluppo normale che in quelli con sviluppo ritardato.

Negli ultimi decenni l'attenzione si è concentrata sullo sviluppo di rivestimenti antivegetativi non tossici basati su polimeri siliconici, in sostituzione dei rivestimenti tossici di uso comune. Col crescere delle quote di mercato dei rivestimenti antivegetativi siliconici, è prevedibile che cresca il loro contributo alla contaminazione ambientale.

Sono stati studiati gli effetti sullo sviluppo embrionale di ricci di mare e di *Oryzias latipes*, piccolo pesce teleosteo (pesce del riso o Medaka) (fig. 5), di 11 rivestimenti antivegetativi: 8 a base di polisilossani (siliconi) - polimeri inorganici basati su una catena silicio-ossigeno e gruppi funzionali organici legati agli atomi di silicio - e 3 rivestimenti reperibili in commercio. Sono stati studiati rivestimenti modello dalla composizione nota e componenti facilmente reperibili sul mercato e le molecole percolate da questi rivestimenti sono state parzialmente identificate e caratterizzate. I rivestimenti antivegetativi del commercio erano dichiarati non tossici e i componenti erano brevettati.

Il protocollo della ricerca prevedeva l'esposizione a rivestimenti antivegetativi degli embrioni di "specie modello", cioè studiate a fondo come modelli animali validati, per verificare se le miscele del complesso, rilasciate dal rivestimento, impattavano sullo sviluppo degli embrioni di queste specie. I ricci di mare sono stati scelti in quanto il loro sviluppo è rapido e gli embrioni possono entrare nello strato antiscivolo, posto sopra le superfici; Medaka è stato usato in quanto la femmina deposita uova, appiccicose e adesive, sulla pinna anale e poi le raschia via, cosi che queste vanno ad aderire alle superfici lisce. Gli embrioni sono stati mantenuti in acqua marina, in piastre a 24 pozzetti, col fondo ricoperto dai rivestimenti antivegetativi oggetti dello studio. Rivestimenti antivegetativi di recente concezione non hanno influenzato lo sviluppo degli embrioni di riccio, mentre i rivestimenti reperibili in commercio lo hanno inibito. Gli embrioni di Medaka, invece, sono andati incontro a una ritardata schiusa delle uova, a un aumento della mortalità dei pesci neonati, a una drammatica riduzione della capacità dei pesci neonati di gonfiare la vescica natatoria e ha ridotto il numero delle uova che si sono schiuse, su tutti i rivestimenti testati. Tutti gli embrioni di riccio, posti sui rivestimenti a base di "siliconi modello" mantenuti immersi in acqua di mare corrente per 30 giorni per simularne l'uso iniziale nell'ambiente marino, sono morti, mentre negli embrioni posti sui rivestimenti in commercio gli effetti tossicologici sono stati meno gravi, anche se il ritardo del loro sviluppo era evidente. Per quando riguarda i rivestimenti di origine commerciale, gli effetti sugli embrioni di pesce, posti in acqua marina sopra rivestimenti dilavati, erano meno gravi di quelli prodotti dagli stessi rivestimenti freschi e riguardavano un minor successo nella schiusa delle uova, una ridotta sopravvivenza delle larve e l'incapacità di gonfiare la vescica natatoria.

Questi risultati, similmente a conclusioni di tipo medico, indicano che i composti rilasciati dai rivestimenti a base di silicone possono impattare negativamente sullo sviluppo. Tuttavia, sono indispensabili ulteriori ricerche utilizzando questi e altri modelli animali (Feng, 2012).

Note

1. Rianodina è un alcaloide con un'elevata affinità di legame per i suoi recettori, un gruppo di canali del calcio che si trovano principalmente nel muscolo scheletrico e nel miocardio. A concentrazioni nanomolari (10^{-9} M) la rianodina blocca i recettori allo stadio semiaperto, mentre quando è presente in concentrazioni micromolari (10^{-6} M) li chiude completamente. Concentrazioni nanomolari di rianodina permettono il rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico, consentendo la contrazione muscolare.

2. Sfingosina è un amminoalcol a lunga catena, precursore degli sfingolipidi, al cui ammino-gruppo è legato, con legame ammidico, un acido grasso saturo quasi sempre composto da 22 atomi di carbonio. E' coinvolta in maniera critica nella regolazione di risposte biologiche fondamentali, quali la proliferazione, il differenziamento, la motilità e la sopravvivenza cellulare, ed è implicata in importanti eventi biologici e patologici come lo sviluppo vascolare, il traffico linfocitario, l'angiogenesi e il cancro.

3. Il recettore della rianodina 1, o RYR-1, è noto anche come canale di rilascio del calcio dal muscolo scheletrico o recettore della rianodina tipo muscolo scheletrico.

4. Tapsigargina è un inibitore non competitivo di una classe di enzimi noti con l'acronimo SERCA, (ATPasi sarco/reticolo endoplasmatico Ca^{2+}-dipendente). Strutturalmente, tapsigargina è classificata come lattone sesquiterpenico, che agisce come promotore tumorale in cellule di mammifero. Tapsigargina aumenta la concentrazione citosolica di Ca^{2+}, bloccando la capacità della cellula di accumulare calcio nei reticoli sarcoplasmatici ed endoplasmatici. Questo grazie a un'azione sui canali ionici del calcio IP-3, dipendenti dal reticolo endoplasmatico, che comporta un iper-afflusso di calcio al citosol. Esso agisce specificamente inibendo la fusione degli autofagosomi con i lisosomi, che rappresenta l'ultima fase del processo di autofagia.

5. L'ultrastruttura delle papule dermali di una stella marina è coerente con la sua funzione respiratoria. Le papule consistono in un epitelio ectodermale esterno di supporto sensoriale, in cellule ghiandolari e di un piccolo plesso nervoso basoepiteliale.

6. Le *heat shock proteins* (HSP) sono una famiglia di proteine prodotte dalle cellule in risposta a condizioni di stress (calore, freddo, luce UV) e durante la cicatrizzazione delle ferite o il rimodellamento dei tessuti. Molte di queste proteine svolgono una funzione di *chaperone* stabilizzando nuove proteine per assicurarne il *folding* corretto o per aiutare il *refolding* di proteine danneggiate dallo stress cellulare. Questo aumento dell'espressione è regolato trascrizionalmente. Le HSP sono virtualmente presenti in tutti gli organismi viventi, dai batteri agli umani.

7.Il metirapone è un farmaco usato nella diagnosi di insufficienza surrenalica e, occasionalmente, nel trattamento della sindrome di Cushing. Il metirapone blocca la sintesi del cortisolo inibendo la steroide 11β-idrossilasi, stimolando la secrezione di ACTH, che a sua volta aumenta i livelli plasmatici di 11-deossicortisolo.

8. L'idantoina, conosciuta anche come *glicolilurea*, è un farmaco comunemente impiegato nel trattamento dell'epilessia. E' ottenuta per doppia condensazione di urea con acido glicolico.

9 - L'equazione di Hammett mette in relazione l'effetto elettronico di gruppi funzionali presenti su una molecola con la reattività della molecola stessa. Consente di stimare gli effetti, sulla reattività di una molecola, della presenza di sostituenti capaci di modificarne la distribuzione elettronica, per effetto induttivo e per risonanza.

10. Lo stadio di prisma è caratterizzato dal cambiamento della forma complessiva dell'embrione e dall'inizio del differenziamento delle strutture della larva.

11.Il gray (Gy) è l'unita di misura della dose di radiazione assorbita del Sistema Internazionale. Un'esposizione di un gray corrisponde a una radiazione che deposita un joule, (definito come 1 $kg \cdot m^2/s^2$), per chilogrammo di materia (sia di tessuti biologici sia di qualsiasi altra cosa). Il gray, definito nel 1940 da Louis Harold Gray, ha sostituito la vecchia unità, il rad; vale la relazione 100 rad = 1 Gy.

12. Le proteine *spicule matrix* sono prodotte dalle cellule mesenchimali primarie e sono presenti nelle spicole di calcite degli embrioni di ricci di mare.

13. La *whole-mount in situ hybridization* è una tecnica potente che permette di comprendere le basi molecolari dello sviluppo embrionale; è usata per visualizzare la localizzazione degli RNA espressi negli embrioni. "*Whole-mount*" indica che l'intero embrione sarà usato nel test, non solo una fettina di tessuto; "*In situ*" significa in posizione e "*hybridization*" si riferisce al legame complementare di una molecola di RNA di sintesi a un trascritto di mRNA della cellula di un organismo.

14. La *BAG family molecular chaperone regulator 3* è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene *BAG3*. Inibisce l'attività di chaperone di HSP70/HSC70 (HSC70 è un repressore dell'attivazione trascrizionale) promuovendo il rilascio del substrato; ha attività anti-apoptotica ed è coinvolta nella *chaperone-assisted selective autophagy* (CASA).

15. L'aldeide poli-insatura decadienale, tossina che agisce da sistema chimico di difesa per le diatomee, ha una peculiarità: è efficace solamente nei confronti dei copepodi gravidi, mentre è del tutto innocua contro i gamberetti adulti. Agisce, quindi, solo in presenza di embrioni, organismi le cui cellule sono in intensa proliferazione e che non sono differenziate, proprio come i tessuti cancerosi, anch'essi caratterizzati da iperproliferazione e scarso differenziamento.

Bibliografia

- Bonaventura, R., Zito, F., Costa, C., Giarrusso, S., Celi, F., Matranga, V., 2011; Stress response gene activation protects sea urchin embryo exposed to X-rays. Cell stress and Chaperons, vol. 16: pp. 681-687.
- Estus, G. S., Frank, D. M., and Blumer, J, L., 1984; Phenytoin teratogenicity in the American Sea Urchin Arbacia punctulata. Pediatric Research, vol. 18: pp. 152 A-152A.
- Estus. G. S., and Blumer, J. L., 1989; Critical period of phenytoin teratogenic action in the sea urchin, Arbacia punctulata embryo. JPET, vol. 251: pp. 782-789.
- Feng, D., Rittschof, D., Orihuela, B., Kwok, K. W., Stafslien, S., Chisholm, B., 2012; The effects of model polysiloxane and fouling- release coatings on embryonic development of a sea urchin (Arbacia punctulata) and a fish (Oryzias latipes) Aquat. Toxicol., vol. 110-111: pp. 162-169.
- Kominami, T., and Takata, H., 2008; Sea Urchin Embryo - A Model System for Analyzing Cellular Activities During Early Development. From: Sourcebook of Model for Biomedical Research, P. M. Conn E. 2008, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
- Maglott, D. R., 1984; Diamide reversibly induces a stress response in the sea urchin, Arbacia punctulata. Cell. Biol. Int. Rep. vol. 8: pp. 747-754.
- Reinisch, C. L., and Bang, F. B., 1971; Cell recognition: Reaction of the sea star (Asterias vulgaris) to the injection of amebocytes of sea urchin (Arbacia punctulata). Cellular immunology, vol. 2: pp. 496-503.
- Romano, G., Costantini, M., Buttino, I., Ianora, A., Palumbo, A., 2011; Nitric Oxide Mediates the Stress Response Induced by Diatom Aldehydes in the Sea Urchin Paracentrotus lividus. PLoS ONE 6 (10): e25980. doi: 0.1371/journal.pone.0025980.
- Rudolph, A., et al., 2009; Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. Environ. Monit. Assess., vol. 155: pp. 419-429.

ARBACIA PUNCTULATA, PARACENTROTUS LIVIDUS E ALTRI RICCI MARINI, MODELLI ANIMALI IN RICERCHE DI ECO-TOSSICOLOGIA MARINA SU METALLI, METALLOIDI E INTERFERENTI ENDOCRINI

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Il modello animale che studia gli stadi precoci della crescita embrionale di *Arbacia punctulata* (fig. 1) e il test di tossicità sugli spermatozoi della stessa specie sono stati usati come modelli animali di paragone nella validazione del kit Microtox R Toxicity Testing (*solid-phase toxicity test*). Microtox è un test di tossicità standardizzato, rapido, sensibile, riproducibile, robusto e rilevante dal punto di vista ecologico, tanto da essere considerato uno standard di valutazione di tossicità acquatica. Il *tets system* usato da Microtox è *Vibrio fischeri* (batterio bioluminescente, a forma di bastoncello, diffuso negli ambienti marini, Gram-, fig. 3): il protocollo prevede che questo batterio sia esposto a un *range* di concentrazioni del materiale da testare. L'intensità della luce emessa dal batterio esposto a sostanze tossiche è inversamente proporzionale alle loro concentrazioni nel campione in esame. Sono stati determinati i valori di tossicità, espressi come EC_{50} (dose efficace al 50%), per 8 composti organici e 5 metalli, sottoposti a test sui 3 *test system*: embrioni e spermatozoi di *Arbacia punctulata* e *Vibrio fischeri* di Microtox. I risultati sono stati confrontati con le LC_{50} (dosi letali al 50%) degli stessi composti organici, in test acquatici standard con *Pimephales promelas* (pesce osseo d'acqua dolce, ciprinide, fig. 5) e *Daphnia magna* (crostaceo cladocero planctonico, fig. 6); per quanto riguarda la valutazione della tossicità degli ioni metallici, *test system* erano *Menidia menidia* (pesce atlantico delle coste nord est degli USA, fig. 7) e *Mysidopsis bahia* (piccolo corostaceo, fig. 8), che vivono nei pressi degli estuari dei grandi fiumi. Sono stati desunti dalla letteratura i valori delle EC_{50} dei composti organici sullo sviluppo embrionale precoce di *Arbacia punctulata* e quelli delle LD_{50} ottenuti con *Menidia menidia* e *Mysidopsis bahia* per i metalli; i risultati ottenuti con *Vibrio fischeri* (Microtox) per i composti organici e i metalli sono stati confrontati con questi valori. I valori delle EC_{50} dei prodotti organici, ottenuti con il test rapido Microtox e il loro *ranking* di tossicità, sono risultati molto vicini ai valori delle LC_{50} e ai ranking di tossicità ottenuti con *Arbacia punctulata*, a eccezione di due valori relativi al test sugli spermatozoi, *test system* che è risultato particolarmente sensibile al 2,4-pentanedione e al 2-metil-2,4-pentanediolo. Le EC_{50} dei metalli erano generalmente confrontabili tra di loro e con quelle ottenute in test che usano embrioni e spermatozoi di altri ricci di mare e ostriche, ma non con le LC_{50} di *Mysidopsis* e *Menidia*. Questi risultati depongono a favore delle potenzialità dei test rapidi nello *screening* di tossicità e nella determinazione dei *rank order* di tossicità (Nacci, 1986).

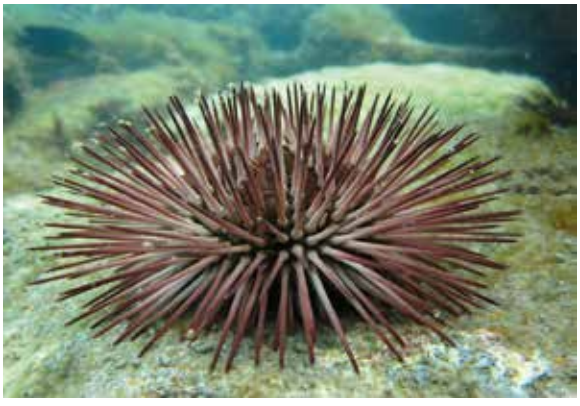


Fig. 1. *Arbacia punctulata* (da: lordhelmet1980.deviantart.com)

La completa validazione di questi metodi è stata raggiunta grazie

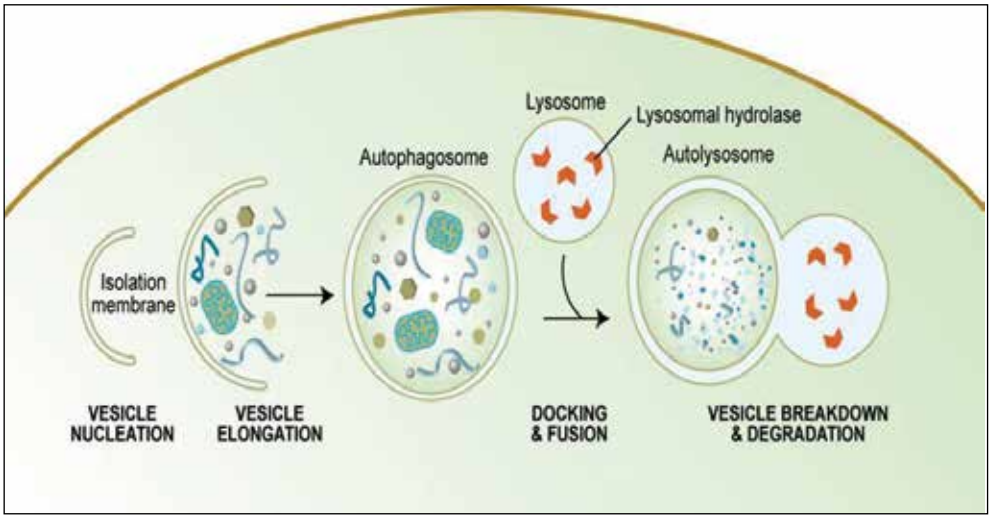


Fig. 2. Diagramma schematico degli step dell'autofagia. Il processo autofagico inizia con la formazione del fagoforo o membrana di isolamento (*vesicle nucleation step*). Si pensa che l'azione concertata delle proteine del meccanismo centrale dell'autofagia, al sito di assemblaggio del fagoforo, porti all'espansione del fagoforo in un autofagosoma (*vescicke elongation*). L'autofagosoma può fagocitare quantità di citoplamsa in modo non specifico, interi organelli inclusi, o carichi target in modo specifico. Quando la membrana esterna dell'autofagosoma si fonde con l'endosoma (formando un anfisoma prima di fondersi col lisosoma) o direttamente con un lisosoma (*docking and fusion step*), forma un autofagolisosoma. Infine, il materiale sequestrato è degradato all'interno del autofagolisosoma (*vesicle breakdown and degradation*) e riciclato.

alle ulteriori informazioni sulla loro affidabilità, rese disponibili nel tempo e grazie al continuo confronto fatto sottoponendo a test un ampio spettro di composti chimici e loro miscele complesse *vs* dati consolidati della letteratura. Numerosi studi sul confronto dei dati ottenuti con Microtox con i risultati di test tossicologici basati su pesci, crostacei e alghe, relativi a prodotti chimici, organici e inorganici, pubblicati in una quantità di lavori scientifici, hanno mostrato un'ottima correlazione, che è alla base della validazione ufficiale di questo kit di tossicologia. Specularmente a questi risultati, lo sviluppo embrionale e il test di citotossicità sugli spermatozoi di *Arbacia punctulata* si confermano modelli animali di riferimento per valutazioni di eco-tossicologia.

Fig. 3. *Vibrio fischeri* (da: trilobiteglassworks)

La tossicità diffusa da sedimenti contaminati nella colonna d'acqua

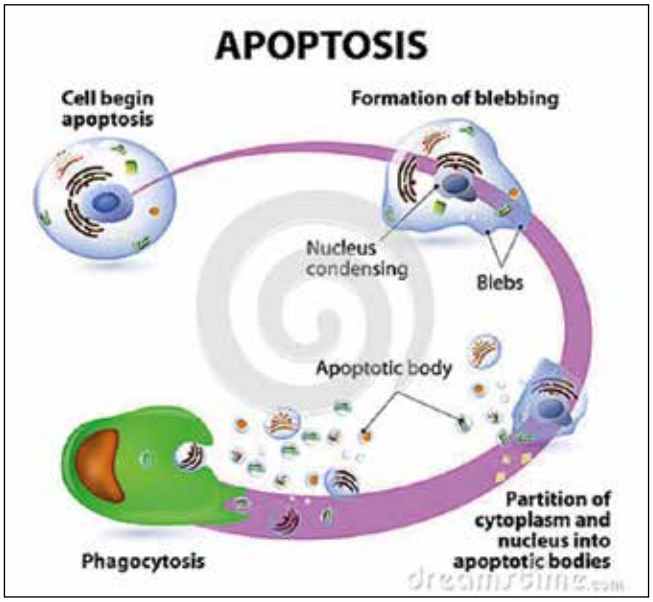


Fig. 4. Diagramma schematico degli step dell'apoptosi (da dreamstime.com)

che li sovrasta è stata studiata in dettaglio. Per quantificare questa tossicità potenziale, l'acqua marina sovrastante 5 sedimenti, 2 incontaminati e 3 contaminati è stata valutata in laboratorio col test di fertilizzazione delle uova di *Arbacia punctulata*. Sono state valutate anche concentrazioni di contaminanti tipo bifenili policlorurati del rame. Per caratterizzare la fonte di tossicità, i campioni sono stati trattati chimicamente, usando la cromatografia a fase inversa, lo scambio cationico e la chelazione. La tossicità presente nella colonna d'acqua e le concentrazioni dei contaminanti sono risultate maggiori nelle esposizioni sospese che in quelle stratificate. La tossicità dell'acqua interstiziale estratta dai sedimenti e le concentrazioni dei contaminanti erano generalmente maggiori sia delle esposizioni stratificate sia di quelle sospese. Il trattamento chimico ha indicato che la tossicità osservata nella colonna d'acqua era, probabilmente, causata da contaminanti metallici e/o da contaminanti organici non ionici. Per contro, il trattamento delle acque interstiziali non ha comportato una riduzione significativa della tossicità, portando alla conclusione che altre sostanze tossiche, come NH_4^+ e H_2S possano essere attive in questo compartimento (Burgess, 1993).

Molti ricercatori hanno studiato il ruolo rilevante della comunicazione *cell-to-cell* durante lo sviluppo e i cambiamenti degli ioni nelle cellule, regolatia loro volta da molecole di segnale del sistema colinergico. I risultati indicano che lo stadio di zigote di riccio di mare è il più adatto per studiare il ruolo del sistema colinergico, perché in questa fase uno *spike* del Ca può essere evocato con esposizione all'acetilcolina o a farmaci colinergici muscarinici, in qualunque momento prima della divisione del nucleo. I risultati così ottenuti aprono la via a un nuovo modo di considerare i *biomarker*. Molti fattori ambientali, infatti, possono interferire col sistema colinergico - stress, ferite e lesioni varie, processi infiammatori e inquinamento in genere – e ciò offre la possibilità di investigare la presenza, nell'ambiente, e il grado di aggressività, di contaminanti neurotossici, quali i pesticidi organofosforici (ad esempio, malathion e parathion, che, trasformato in paraoxon, interferisce con la produzione di acetilcolinesterasi) e i carbammati, inibitori diretti dell'acetilcolinesterasi (aldicarb, zectram, mobam),

Fig. 5. *Pimephales promelas* (da: mblaqua-culture.com)

Fig. 6. *Daphnia magna* (da: micro.sci-toys)

Fig. 7. *Menidia menidia* (da: datuopinion.com)

Fig. 8. *Mysidopsis bahia* (da: animalia-life.com)

meno tossici e più degradabili. Queste sostanze, largamente usate in Europa per molti scopi, tra i quali la disinfestazione in agricoltura e i trattamenti medici, agiscono interferendo con la regolazione del sistema colinergico e con i conseguenti eventi elettrici. Gli zigoti dei ricci mare possono offrire un modello affidabile da usarsi nei biosensori, con la capacità di tradurre gli effetti dei pesticidi neurotossici, e in special modo dei contaminanti che inducono stress, in risposte in cellule vive, come sono le risposte elettriche (Angelini, 2005).

Per la valutazione tossicologica di sostanze che entrano nell'ambiente marino è preferibile effettuare test eco-tossicologici organizzati in set base di *taxa* che coinvolgono specie *target*, appartenenti a diversi livelli trofici. Ad esempio, una batteria composta da *Vibrio fischeri* (batterio), *Dunaliella tertiolecta* (alga verde unicellulare), *Tigriopus fulvus* (crostaceo), *Paracentrotus lividus* (echinoderma) e *Dicentrarchus labrax* (pesce) è stata usata per testare la

tossicità acuta del sodio dodecil-solfato (SDS). SDS è un surfattante anionico ampiamente impiegato nell'industria, in agricoltura, nell'uso domestico, in ricerca e lo si ritrova abbondante nell'ambiente, in particolare in quello marino. I valori medi di tossicità (EC_{50}), 2,6 (*Vibrio fischeri*), 4,8 (*Dunaliella tertiolecta*), 7,4 (*Tigriopus fulvus*), 3,2 (*Paracentrotus lividus*) e 7,3 (*Dicentrarchus labrax*) mgL^{-1}, indicano un'elevata tossicità acuta di SDS in tutti i livelli trofici rappresentati dalle specie target sottoposte a test, ed evidenziano l'utilità di usare, in eco-tossicologia, un set base di *taxa* piuttosto che una singola specie, in modo da ottenere informazioni più affidabili nella valutazione della tossicità e dei potenziali pericoli per l'ambiente marino, rappresentati da sostanze selezionate (Mariani, 2006).

Una ricerca su embrioni di *Arbacia punctulata*, risalente alla meta degli anni '30 del secolo scorso, investigò gli effetti del litio sullo sviluppo embrionale di riccio di mare. Le uova di *Arbacia,* e degli echinodermi in genere, sono molto sensibili agli effetti del litio aggiunto all'acqua marina. E stata usata una concentrazione di litio che induce il tipico *"lithium development"* (il litio agisce inibendo la glicogeno sintetasi chinasi-3 $\beta 1^1$ (GSK-3 β) che regola la determinazione del destino cellulare in vari organismi). Le cellule epiteliali di blastule normali e di blastule esposte al litio sono state "stirate" con microaghi e staccate l'una dall'altra. Dopo il distacco, le cellule delle blastule di controllo hanno assunto forma arrotondata, mentre quelle delle larve esposte al litio sono rimaste deformi. Lo strato di plasma ialino, che ricopre l'oocita, non indurisce in presenza di litio nell'acqua marina e non è necessario per l'appiattimento delle cellule che si verifica durante lo sviluppo. La presenza di pieghe dello strato di plasma ialino al polo vegetativo, nella tarda blastula e nella gastrula iniziale, non ha trovato spiegazioni. Piocianina[2], aggiunta all'acqua di mare contenente litio, contrasta l'effetto del litio e migliora lo sviluppo dell'embrione. Queste e altre evidenze indicano che il litio non esercita semplicemente un'influenza sulla struttura del protoplasma, ma anche sulla respirazione cellulare (Runnstrom, 1935).

Modelli animali nella valutazione eco-tossicologica di metalli e metalloidi

Gli effetti (eco)tossicologici di prodotti chimici dispersi nelle acque marine, soprattutto in quelle costiere, sono generalmente studiati immergendo gli embrioni di *Arbacia* in acqua di mare nella quale è stato sciolto il prodotto in esame. Gli effetti tossici sono facilmente e rapidamente rilevabili sotto forma di ritardi nello sviluppo e/o nella comparsa di malformazioni dell'embrione.

Sono stati esaminati gli effetti tossici interattivi di metalli pesanti, presenti alle concentrazioni rilevate in acque effluenti da miniere. Con varie combinazioni di metalli, si è scoperto che lo zinco è uno degli elementi responsabili di malformazioni quali la perdita dell'asse orale-aborale e della riduzione delle dimensioni del tratto digestivo, e questi effetti sono aggravati dalla presenza di altri metalli, quali manganese, piombo, ferro e stagno. Gli embrioni di *Arbacia punctulata*, e degli echinodermi in genere, forniscono molti modelli per lo studio delle interferenze di ioni metallici su svariate funzioni cellulari. Tra i *bioassay* tossicologici che usano gameti e larve di organismi marini, quello basato sugli spermatozoi di ricci di mare ha il vantaggio di essere rapido e sensibile a un ampio spettro di sostanze tossiche, più sensibile, in particolare, dei test che usano animali adulti per valutare la tossicità di effluenti complessi.

Un test, messo a punto da ricercatori cileni, è stato usato per studiare la tossicità dei composti inorganici e organici presenti in ecosistemi marini del Cile; in particolare è stata studiata la tossicità di Cu, Cr, Cd e Zn e del pesticida cancerogeno pentaclorofenolo. Il test di tossicità negli spermatozoi richiede solo 60 minuti di esposizione al campione in esame, mentre i test basati sullo sviluppo embrionale e larvale, di pari sensibilità, richiedono da 2 a 4 giorni di esposizione.

Nel 1994 la *Environmental Protection Agency* (EPA, USA) ha incluso questo test, che usa protocolli di laboratorio basati su *Arbacia punctulata*, nel suo *Complex Effluent Assessment Program* (Larrain, 1999).

Il *test system* riccio di mare è stato affinato e messo a punto in vari laboratori, così da diventare un *bioassay* estremamente informativo e sensibile alla presenza di contaminanti singoli o di miscele di xenobiotici. Agenti chimici nocivi possono essere identificati e caratterizzati, dal punto di vista biologico, in modo da fornire un set integrato di dati relativi a eventi chiave, quali la fertilizzazione degli oociti, l'attività mitotica e l'embriogenesi; un tale bioassay può contribuire alla valutazione dell'impatto ambientale dei contaminanti grazie alla messa a fuoco di importanti aspetti tossicologici.

Sono stati studiati alcuni contaminanti inorganici e loro miscele: Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} e Se^{4+}, e sono stati presi in considerazione cambiamenti subletali del pH come fattore addizionale di *stress* in grado di condizionare la tossicità dei vari elementi sottoposti a test. *Test system* sono stati spermatozoi ed embrioni di *Paracentrotus lividus* e spermatozoi di *Echinus esculentus*. Sono stati osservati *pattern* distinti di embrio-tossicità per i diversi agenti studiati, consistenti in difetti dello sviluppo a concentrazioni relativamente elevate per Cd^{2+} e Se^{4+} ($>10^{-5}$ kmol/m^3), mentre gli effetti embrio-tossici di Cu^{2+} e Zn^{2+} erano indotti a concentrazioni inferiori ($5x10^{-7}$ kmol/m^3), vicine alle loro concentrazioni marine naturali. L'esame citogenetico degli embrioni esposti non ha evidenziato alterazioni morfologiche o quantitative dell'attività mitotica ai livelli embrio-tossici dei 4 elementi testati. La fertilizzazione degli oociti da parte degli spermatozoi esposti a questi elementi è stata condizionata da alterazioni dei *test system* dipendenti dalle concentrazioni di contaminanti: piccoli aumenti delle [Cd^{2+}] e [Cu^{2+}] hanno incrementato la fertilizzazione degli oociti fino ai livelli di concentrazione critici, rispettivamente 10^{-7} e 10^{-6} kmol/m^3, oltre i quali si e registrato un brusco calo dell'efficienza della fertilizzazione. La presenza simultanea di Zn^{2+} e di Se^{4+} ha cambiato drasticamente il *pattern* dose-risposta in funzione delle differenti miscele di elementi e delle specie testate.

Questi risultati testimoniano: 1) che è necessario tener conto della presenza simultanea di vari contaminanti; 2) l'impatto combinato dei quali può essere sostanzialmente diverso da quello delle singole tossine. Inoltre, questi risultati dimostrano l'elevata sensibilità del *bioassay* basato sui ricci di mare, che risponde a minimi aumenti delle concentrazioni di microelementi e contaminanti al di sopra delle loro concentrazioni naturali (Pagano, 1986).

Dai dati di eco-tossicologia marina, spunti per originali terapie antitumorali?

È stato studiato, in *Paracentrotus lividus*, il fenomeno dell'autofagia indotta dall'esposizione a cadmio (Cd) e arsenico (As). e sono stati investigati i rapporti tra autofagia[3] (fig. 2) e apoptosi (fig. 4).

È noto che gli embrioni di questo riccio di mare sono capaci di attivare diverse strategie difensive contro lo *stress*. Il trattamento con Cd innesca l'accumulo di questo metallo nelle cellule dell'embrione e attiva sistemi di difesa in base alla sua concentrazione e alla durata dell'esposizione, attraverso la sintesi di *heat shock protein* e/o l'inizio dell'apoptosi. Il Cd è un metallo pesante comunemente rilevato in ambienti acquatici e terrestri, nei quali è rilasciato sia da fonti naturali (eruzioni vulcaniche, erosione delle coste e dilavamento della crosta terrestre) sia da attività antropocentriche (coloranti, batterie Ni-Cd, fusione di metalli). Rilasciati nell'ambiente, i metalli pesanti fluiscono nei fiumi e da qui nel mare, o raggiungono il mare trasportati da canali di scarico e acque di scolo. Possono anche essere scaricati direttamente in mare da insediamenti industriali fronte mare. Il Cd penetra nelle cellule e vi si accumula, interagendo con componenti cellulari e target molecolari. La tossicità di questo metallo si estrinseca tramite il blocco della fosforilazione ossidativa, la deplezione di gluta-

tione, l'inibizione di attività enzimatiche anti-ossidative, la produzione di *reactive oxygen species* (ROS), l'induzione di danni al DNA, l'inibizione di meccanismi di DNA-*repair* e la riduzione generalizzata della sintesi proteica. Gli embrioni di *Paracentrotus lividus*, esposti al Cd, adottano un ulteriore stratagemma per salvaguardare il loro programma di sviluppo: l'autofagia. Per ora, mancano dati sul ruolo di questo processo nello sviluppo embrionale di organismi marini (Chiarelli, 2011).

Negli ultimi anni le ricerche sui processi autofagici si sono intensificate, invadendo campi propri della biologia e della medicina. Studiando questo processo molecolare in sistemi biologici differenti, in condizioni fisiologiche e di *stress*, sono stati individuati vari *marker* del processo autofagico e ne sono state descritte varie strategie, mentre i meccanismi di tossicità, indotta da metalloidi e metalli pesanti, continuano a essere materia di studio a causa della natura ubiquitaria e dell'indiscriminata distribuzione di questi elementi nell'ambiente, dove giocano il ruolo di contaminanti di numerosi organismi.

Una rassegna della letteratura specialistica per analizzare criticamente e mettere in correlazione le conoscenze sui meccanismi di autofagia studiati in condizioni di stress, per gli elementi più comuni, As e Cd, ha permesso di confrontare i risultati ottenuti in differenti modelli sperimentali e ha evidenziato similitudini e/o differenze riguardo l'attivazione del processo autofagico. L'attivazione dell'autofagia in embrioni di ricci esposti al Cd è un sistema modello affidabile e molto sensibile allo stress ambientale; inoltre il Cd, uno dei metalli pesanti induttori di stress più studiati, è un modulatore di fattori e strutture quali proteina chinasi e fosfatasi, caspasi, mitocondri, *heat shock protein*, metallotioneine[4], fattori di trascrizione, *reactive oxygen species*, apoptosi e processi autofagici (Chiarelli, 2012).

L'apoptosi è un tipo di morte cellulare programmata che avviene fisiologicamente e/o patologicamente in risposta a stimoli come la selezione di cellule in tessuti proliferanti e durante l'embriogenesi o l'eliminazione di cellule inutili. L'autofagia è un processo che si innesca in carenza di nutrienti e consiste nella fagocitosi degli organelli cellulari; a livello basale, rappresenta il principale meccanismo di regolazione del *turnover* dei componenti citoplasmatici, di rimozione selettiva degli organelli cellulari danneggiati e degli aggregati di proteine tossiche, e di riciclo dei componenti cellulari, sia in condizioni basali che in condizioni di stress, nelle cellule eucariote. L'autofagia è indotta e regolata da mTOR[5], chinasi col ruolo di sensore dei livelli di energia e degli amminoacidi disponibili. Durante il processo autofagico, parti del citoplasma vengono segregate, enzimaticamente, in vescicole a doppia membrana (autofagosomi) e poi fuse con i lisosomi grazie all'intervento di proteine che favoriscono l'aggancio alle vescicole, formando vescicole a membrana singola (autolisosomi), mentre proteine particolari sono accompagnate verso i lisosomi dalle *chaperonine* HSP90 e HSP70 (*heat shock protein*). Il contenuto degli auto-fago-lisosomi è degradato dalle idrolasi lisosomiali e riciclato per ricuperare energia. Alla fine, l'autofagia è un processo finalizzato alla sopravvivenza cellulare, che pone alla cellula il dilemma "vivere o morire". Tuttavia, un'autofagia massiva e persistente può uccidere cellule, già gravemente danneggiate, tramite una forma di morte cellulare caspasi-indipendente, chiamata morte cellulare di tipo II.

Similmente all'apoptosi, l'autofagia è un evento essenziale e critico del processo di sviluppo embrionale - in assenza di autofagia, si ha arresto, ritardi e/o difetti dello sviluppo - oltre che della regolazione e del mantenimento dell'omeostasi negli organismi pluricellulari. Autofagia e apoptosi possono essere viste come processi che, tra loro alternativi o in combinazione, sono messi in atto dalle cellule esposte a concentrazioni tossiche di metalli pesanti o di metalloidi. La relazione tra autofagia e apoptosi non è ancora del tutto chiarita, mentre il multiforme rapporto dell'autofagia con la tumorigenesi e le ricerche che ne avvalorano un ruolo, sia nella soppressione che nella progressione tumorale, sono tuttora in attesa di conferme. Appare, comunque, innegabile che l'induzione dell'autofagia nel trattamento del cancro possa

sfociare in approcci terapeutici originali e innovativi: ad esempio, l'induzione con triossido di arsenico (As_2O_3) della morte cellulare autofagica lascia intravvedere nuove e promettenti opportunità per il trattamento dei gliomi maligni resistenti ed è in valutazione clinica. Per una comprensione completa delle risposte molecolari indotte da metalli pesanti e metalloidi pare opportuno aggiungere nuovi *biomarker* caratterizzati da elevata sensibilità e specificità, e l'autofagia pare essere un buon *marker* di tossicità, in quanto è un meccanismo catabolico specifico, evolutivamente conservato in lieviti, piante e animali, uomo compreso. In questo contesto, l'embrione di riccio di mare è uno dei modelli animali più adatti per ampliare e approfondire le conoscenze sull'autofagia ottenute da cellule di lieviti, piante e mammiferi, e per trovare una risposta sul controllo dell'autofagia durante lo sviluppo fisiologico e in condizioni di stress (Chiarelli, 2012).

L'autofagia è una forma adattativa a una varietà di stimoli extra- e intracellulari e risponde all'ambiente cellulare: quindi, qualunque alterazione ambientale può portare alla deregolamentazione di questo processo, che potenzialmente comporta la morte della cellula. Tra queste, un recente studio di Chiarelli *et al*. (2014) sulle diverse strategie di difesa, attivate in condizioni di stress da embrioni di ricci di mare, ha messo a fuoco questo confronto. Il Cd si accumula, in modo dose- e tempo-dipendente, nelle cellule embrionali, attivando meccanismi di stress e di difesa, inclusa la sintesi di *heat shock protein*, apoptosi iniziale e/o autofagia. Questi Autori hanno studiato il rapporto funzionale tra apoptosi e autofagia, valutando segnali di apoptosi in embrioni di *Paracentrotus lividus* esposti al Cd, contaminante comune di ambienti acquatici e terrestri, nei quali l'autofagia era inibita con 3-metil adenina. L'inibizione dell'autofagia ha comportato una riduzione simultanea dell'apoptosi, indicando che questi due processi sono, in qualche modo, correlati. Se si considera che l'autofagia ha un ruolo catabolico, si può avanzare un'ipotesi energetica per spiegare questo rapporto. Usando un substrato per la produzione di ATP si è trovato che l'apoptosi - valutata con TUNEL[6] e immunoistochimica di *cleaved caspase-3* (ASP175) (5A1) Rabbit mAb #9664[7] - è stata ripristinata in embrioni esposti al Cd, nei quali l'autofagia era stata inibita con 3-metil adenina, bloccante della formazione degli auto-fago-lisosomi tramite il blocco della fosfatidilinositolo 3-chinasi di tipo III.

Questi risultati permettono di concludere che l'autofagia gioca un ruolo nella risposta allo stress degli embrioni di *Paracentrotus lividus*, in quanto potrebbe contribuire energeticamente al processo apoptotico tramite il suo ruolo catabolico (Chiarelli, 2014).

Embrioni di ricci di mare nella valutazione tossicologica di estradiolo e di interferenti endocrini

Risultati di un numero crescente di ricerche indicano che numerosi prodotti chimici, naturali e di sintesi, possono interferire con il sistema endocrino e produrre effetti negativi negli animali di laboratorio, nel bestiame per alimentazione, nella fauna e nell'uomo. Per questa ragione sono chiamati interferenti endocrini ambientali (*interfering endocrine disruptors,* IEA) o modulatori endocrini o ormoni ambientali, e si possono trovare in molti prodotti di uso quotidiano (bottiglie e contenitori di plastica, film di protezione di cibi in scatola, detergenti, sostanze ignifughe, cibi, giocattoli, cosmetici e pesticidi). Sebbene l'informazione scientifica sugli effetti potenzialmente negativi degli IEA sulla salute umana sia limitata, si registra un allarme crescente riguardo la loro presenza nell'ambiente, perché è dimostrato che, anche a concentrazioni molto basse/minime, queste sostanze producono effetti avversi nelle specie di allevamento, in quelle selvatiche e negli animali di laboratorio. I loro effetti sulla salute umana sono difficili da cogliere e studiare, in quanto la popolazione è di solito esposta simultaneamente a molteplici IEA. Gli IEA, di origine naturale o di sintesi chimica, possono mimare/

interferire con le funzioni del sistema endocrino: possono accendere, spegnere, modificare segnali ormonali, influenzando le normali funzioni di tessuti e organi.

Le attività avverse di molti IEA sono state messe in relazione con alterazioni dello sviluppo, della *performance* riproduttiva, dei sistemi nervoso e immunitario, sia delle specie in natura sia in animali da esperimento.

Ricerche dimostrano l'induzione, da parte di queste sostanze, di effetti simili anche sulla salute umana, che comportano riduzione della fertilità e aumentata incidenza e/o progressione di alcune patologie, quali obesità, diabete ed endometriosi, incluse alcune neoplasie. La popolazione può essere esposta all'azione degli interferenti endocrini attraverso il cibo e le bevande, le medicine, i pesticidi e i cosmetici.

Alcuni interferenti, come il DDT, le diossine e i bifenili policlorurati (usati in apparecchiature elettriche), si degradano molto lentamente nell'ambiente: sono perciò molto resistenti e si accumulano negli ecosistemi e negli organismi che, per una qualunque ragione, vengano in loro contatto. Particolarmente preoccupante è l'esposizione professionale a queste sostanze degli operatori agricoli che li diffondono nell'ambiente e di, conseguenza, contaminano terreno, fauna e flora, falda freatica e acque marine, in particolar modo costiere (e, quindi, anche fauna e flora marine) e in certe lavorazioni industriali. Gli IEA sono strutture che appartengono a varie classi chimiche, caratterizzate da diverse attività ormonali ed esercitano i loro effetti, sia diretti sia indiretti, grazie a processi mediati da interazioni recettoriali, mimando gli ormoni endogeni e/o inibendo le loro normali attività ormonali e/o metaboliche.

Fino a pochi anni or sono, le conoscenze sugli effetti degli IEA sulla fisiologia, sulla riproduzione e sullo sviluppo degli echinodermi scarseggiavano. Una decina di anni fa è stata fatta una ricerca su embrioni in sviluppo di due ricci marini, *Strongylocentrotus purpuratus* (riccio color porpora) e *Lytechinus anamesus* (riccio bianco), che vive lungo le coste del Messico, della California e del nord America (Oceano Pacifico), esposti a 2 IEA noti: 4-ottilfenolo[7] (OCT, $HOC_6H_4C_8H_{17}$, derivato del fenolo, per sostituzione di un atomo di idrogeno dell'anello con il radicale ottile) e bisfenolo A8 (BPA, composto organico con due gruppi fenolici, noto anche come 2,2-bis (4-idrossifenil) propano, $C_{15}H_{16}O_2$). Embrioni di questi due ricci di mare, inoltre, sono stati esposti a 5 ormoni steroidei, naturali e sintetici, della sfera riproduttiva: 17β-estradiolo (E2), estrone (E1, ormone estrogenico secreto dall'ovaia e dal tessuto adiposo), 3-idrossiestra-1,3,5 (10)-triene-17-one, $C_{18}H_{22}O_2$), estriolo (E3, (16α, 17β)-estra-1,3,5 (10)-triene-3,16,17-triolo, uno dei vari estrogeni coniugati che vengono utilizzati contro i sintomi della menopausa), progesterone (P4) e 17α-etinilestradiolo (EE2). Ancora, sono stati studiati 2 IEA non estrogenici: tributiltin (TBT, biocida altamente tossico, immunosoppressore e induttore dello sviluppo di caratteri maschili nelle femmine, largamente usato per prevenire la crescita di organismi marini sulla parte sommersa degli scafi delle grandi navi) e o,p-DDD (mitotane, agente antitumorale, usato nel trattamento del carcinoma corticosurrenale, isomero di DDD e derivato del DDT). Il pluteo larvale, allo stadio di sviluppo di 96 ore dopo la fertilizzazione è il *test system* usato per definire i rapporti concentrazione-effetto dei 9 prodotti in esame. Il *rank order* delle potenze (EC_{50}) di questi prodotti nella limitazione del normale sviluppo embrionale è stato: TBT *Lythechinus anamesus* > OCT>TBT *Strongylocentrotus purpuratus* >>*E2*>EE2>DDD>>BPA>P4>E1>>E3. L'effetto di TBT e risultato marcato persino a concentrazioni notevolmente più basse di quelle comunemente rilevate in aree pesantemente contaminate, ma la risposta è risultata significativamente diversa nei due modelli animali. Gli embrioni di questi 2 ricci marini sono risultati, generalmente, più sensibili agli IEA estrogenici e al TBT di molte altre larve di invertebrati.

Sono stati inoltre effettuati esperimenti sulla specificità della fase di esposizione, per individuare i periodi dello sviluppo embrionale più sensibili: blastula, gastrula e stadi post-gastrula (pluteo) sono stati esposti a modulatori selettivi dei recettori estrogenici, aggiunti da soli o

in combinazione con IEA estrogenici, per interferire con potenziali attività recettore-mediate. Lo stadio embrionale più sensibile a E2, OCT e TBT è risultato quello di blastula, con minor sensibilità complessiva nello stadio di gastrula, indipendentemente dalle concentrazioni sottoposte a test. Tamoxifene (TAM), agonista parziale del recettore dell'estradiolo, ha inibito da solo lo sviluppo embrionale a concentrazioni molto basse (0,02 ng/mL) ed è stato efficace, a questa concentrazione, nel diminuire le sensibilità degli embrioni all'estradiolo e agli IEA estrogenici. Anche ICI 182,780, antagonista estrogenico caratterizzato da alta affinità per il recettore degli estrogeni, ha inibito lo sviluppo embrionale a concentrazioni bassissime (0,03 ng/mL), ma ha aumentato la sensibilità dell'embrione all'estradiolo e agli IEA estrogenici.

Estradiolo e IEA estrogenici inducono tossicità dello sviluppo nei ricci marini attraverso un meccanismo sensibile al TAM, ma insensibile a ICI 182,780. Non à ancora stato dimostrato se questo meccanismo coinvolge un recettore nucleare estrogeno-responsivo, un recettore di membrana funzionalmente collegato o non collegato al recettore nucleare, o un meccanismo di tossicità del tutto diverso. Tuttavia, la precoce sensibilità dell'embrione e la risposta differenziale alla co-incubazione con modulatori selettivi del recettore estrogenico sembrano deporre a favore del fatto che più di un meccanismo di azione sia presente e coinvolto nello sviluppo embrionale dei ricci di mare (Roepke, 2005).

Note

Nota 1. La glicogeno sintetasi chinasi-3 (GSK-3) è una *proline-directed serine-threonine kinase,* identificata inizialmente come agente fosforilante e inattivante della glicogeno sintetasi. Due isoforme, alpha (GSK3A) e beta, mostrano un alto grado di omologia amminoacidica. GSK3B è coinvolta nel metabolismo energetico, nello sviluppo delle cellule neuronali e nella *body pattern formation* (costituzione delle simmetrie basiche corporee e ripetizioni di parti durante lo sviluppo).

Nota 2. La piocianina, pigmento antibiotico e tossina, è prodotta e secreta dal batterio *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-). È di colore blu ed è un metabolita 2^{ario} capace di ossidare e ridurre altre molecole: è un fattore di virulenza ossidoriduttivamente attivo, che permette a *P. aeruginosa* di uccidere le cellule dell'ospite, contrastare i movimenti delle cilia, inibire la proliferazione dei linfociti e alterare la fagocitosi. Perciò, piocianina è battericida e citotossica per le cellule polmonari di mammifero. *Pseudomonas* infetta i pazienti affetti da fibrosi cistica. Grazie alle sue proprietà redox, piocianina genera *reactive oxygen species* (ROS).

Nota 3. L'autofagia è un processo catabolico - evolutivamente conservato in cellule di lievito, piante e animali - che, a livello basale, rappresenta il principale meccanismo di regolazione del turnover dei componenti del citoplasma e di rimozione selettiva degli organelli danneggiati. Esistono diversi tipi autofagia: in tutti casi si ha la degradazione, attraverso i lisosomi, di uno o più costituenti cellulari, e quasi tutti i tipi di autofagia prevedono la formazione di vescicole a doppia membrana che inglobano, isolano e separano dal resto della cellula il materiale da degradare.

Nota 4. Le metallotioneine costituiscono una famiglia di proteine ricche di cisteina, di bassa massa molecolare (da 500 a 14000 Da). Sono localizzate nelle membrane dell'apparato di Golgi e hanno la capacità di legare i metalli pesanti, sia di origine fisiologica (come zinco, rame, selenio) che di origine xenobiotica (come cadmio, mercurio, argento, arsenico) attraverso i gruppi tiolici dei suoi residui cisteinici, che costituiscono il 30% circa dei suoi residui amminoacidici.

Nota 5. mTOR (*mammalian target of rapamycin*, *bersaglio della rapamicina nei mammiferi*) è una protein-chinasi che fosforila serina e treonina, che regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule, la sintesi proteica e la trascrizione. mTOR integra lo stimolo proveniente da percorsi superiori, inclusi insulina, fattori di crescita (come IGF-1 e IGF-2) e mitogeni, e percepisce anche i nutrienti cellulari, i livelli di energia e lo stato redox. La *pathway* della mTOR appare sregolata in diverse patologie umane, specialmente in alcuni tipi di cancro. La rapamicina è un antibiotico che può inibire la mTOR associandosi col suo recettore intracellulare.

Nota 6. TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) è un metodo grazie al quale è possibile rilevare la presenza di DNA frammentato. Per questo motivo, il saggio TUNEL è di elezione quando - nell'ambito di una indagine citoistochimica o diagnostica - si ricercano gli eventi di apoptosi cellulare. Nel processo apoptotico, difatti, le endonucleasi digeriscono il DNA, producendo numerosi frammenti con estremità 3'-OH libere (*apoptotic DNA ladder*).

Nota 7. Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb rileva livelli endogeni del grande frammento (17/19 kDa) della caspase-3 attivata, risultante dal clivaggio adiacente ad Asp175. Questo anticorpo non riconosce la caspasi-3 intera o altre caspasi clivate.

Nota 8. Ottilfenolo è impiegato per stabilizzare l'etilcellulosa alla luce e al calore, come plastificante, come ingrediente di inibitori di corrosione solubili in oli minerali, di antiossidanti, di agenti bagnanti e disperdenti, e come intermedio nella sintesi di prodotti farmaceutici; esplica anche un'energica azione antisettica. È usato anche per la preparazione di resine ottilfenoliche (resine fenoliche in cui sono presenti catene alchiliche a 8 atomi di carbonio, in posizione para rispetto agli ossidrili fenolici; tali catene rendono le resine molto compatibili con gli idrocarburi e gli oli, e trovano impiego nelle vernici).

Nota 9. Bisfenolo A è un mattone fondamentale nella sintesi di alcune materie plastiche e di certi additivi. La sua produzione annua, di 2–3 milioni di tonnellate, ne fa uno dei monomeri principali nella produzione del policarbonato.

Bibliografia

– Angelini, C., et al., 2005; Cell Signalling during Sea Urchin Development: A Model-for Assessing Toxicity of Environmental Contaminants. Progress in Molecular and Subcellular Biology, Subseries Marine Molecular Biotechnology. V. Matranga (E.), Echinodermata,vol. 39: pp. 45-70 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
– Burgess, R. M., McKinney, R. A., Schweitzer, K. A., and Phelps, D. K., 1993; Contaminated marine sediments: Warter column and interstitial toxic effects. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 12: pp. 127-138

– Chiarelli, R., et al., 2011; Sea urchin embryo as a model system for studying autophagy induced by cadmium stress. Autophagy, vol. 7: pp. 1028-1034.
– Chiarelli, R., et al., 2012; Heavy Metals and Metalloids as Autophagy Inducing Agents: Focus on Cadmium and Arsenic. Cells, vol. 1: pp. 597-616.
– Chiarelli, R., Agnello, M,, Bosco, L., Roccheri, M.C., 2014; Sea urchin embryos exposed to cadmium as an experimental model for studying the relationship between autophagy and apoptosis. Marine Environmental Research, vol. 93: pp. 47-56.
– Larrain, A., et al., 1999; Toxicity of Metal and Pesticides Using the Sperm Cell Biossay with the Sea Urchin Arbacia Punctulata. Bu. Environ. Contam. Toxicol., vol. 62: pp. 749-757.
– Mariani, L., et al., 2006; The use of a test battery in marine ecotoxicology: The acute toxicity of sodium dodecyl sulfate. Environmental Toxicology, vol. 21: pp. 373-379.
– Matranga, V., et al., 2010; Embryonic development and skeletogenic gene expression affected by X-rays in the Mediterranean sea urchin Paracentrotus lividus. Ecotoxicology, vol. 19: pp. 530-537.
– Nacci, D, et al., 1986; Comparative evaluation of three rapid marine toxicity tests: Sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity and microtox. Environmnental toxicology, vol. 5: pp. 521-525.
– Pagano, G., et al., 1986; The Sea Urchin: Bioassay for the Assessment of Damage from Environmental Contaminants. Community Toxicity Testing, ASTM STP 920, John Cairns, Jr., E., American Society For Testing and Materials, Philadelphia, pp. 66-92.
– Reinisch, C. L., and Bang, F. B., 1971; Cell recognition: Reaction of the sea star (Asterias vulgaris) to the injection of amebocytes of sea urchin (Arbacia punctulata). Cellular immunology, vol. 2: pp. 496-503.
– Rock, M. O., et al., 2011; Development of Sea Urchin Arbacia Punctulata in the Presence of the Environmental Toxin Sodium Hypochlorite. JEP, vol. 2: pp. 1127-1133
– Roepke, T., et al., 2005; Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embrio at environmentally relevant concentrations. Aquatic Toxicology, vol. 71: pp. 155-173.
– Romano, G., et al., 2011; Nitric Oxide Mediates the Stress Response Induced by Diatom Aldehydes in the Sea Urchin Paracentrotus lividus. PLoS ONE 6 (10): e25980. doi: 10.1371/journal.pone.0025980.
– Rudolph, A., et al., 2006; Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture area of Chile. Nat. Cell Biol., vol. 8: pp. 1149-1154.
– Runnstrom, J., 1935; An analysis of the action of lithium on sea urchin development. Biol. Bull., vol. 68: pp. 378-384.

CISTI TRICHILEMMALI E IPOTRICOSI NEL SUINO SONO SIMILI A QUELLE DELL'UOMO

FRANCO GUARDA[1], ENRICO BOLLO[2], GIOVANNI LORIS ALBORALI[3], STEFANO GIOVANNINI[3], MATTEO GRADASSI[3], MICHELE APICELLA[4], MARIA TERESA CAPUCCHIO[2]

[1] Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; [2] Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Brescia; [4] ASL CN1, Saluzzo (Cuneo)

Introduzione

Gli autori ritengono interessante segnalare la presenza di un'inusuale patologia cutanea osservata al macello in un giovane suino riproduttore per la sua peculiare morfologia, anche in rapporto alla diagnosi differenziale con le complesse lesioni cutanee più o meno simili.

Osservazioni personali

Un suino maschio di 18 mesi di età è stato inviato alla macellazione per problemi locomotori. Purtroppo non sono disponibili maggiori informazioni anamnestiche. Alla visita antemortem si notava una scarsità di peli sulla superficie cutanea del dorso.

Alla visita ispettiva si repertava la cute dorsale nella parte caudale rada di peli. I pochi peli presenti apparivano più piccoli della norma, delicati e facilmente frantumabili. Si potevano evidenziare inoltre due piccoli e sottili orifizi comunicanti con il derma a cul di sacco (fig. 1). Al taglio seriato della cute dorsale si osservava nello spessore del derma la presenza di piccole cavità/cisti di forma ovalare, rotondeggianti o affusolate, alcune in piccoli gruppi, altre isolate, del volume di un pisello, di un seme di mais o ancora più piccole, di colore brunastro, talvolta semivuote, tal'altra contenenti materiale sebaceo con residui di peli autolitici, eventualmente raccolti a gomitolo (fig. 2,3).

In suddette cavitazioni, nelle quali buona parte del materiale era fuoriuscito durante le operazioni di taglio, si riscontrava inoltre la presenza di peli liberi originatisi dalla parete cavitaria, i quali per la loro lunghezza potevano debordare dall'orlo della cavità stessa (fig. 4).

Le cisti erano per lo più disposte in direzione parallela alla superficie esterna oppure leg-

Fig. 1. Suino, cute. Cisti trichilemmale nel derma e ipotricosi; notare i peli rarefatti e l'orificio della cisti comunicante con il derma

Fig. 2. Suino. Cute. Sezioni trasversali seriate. Numerose cisti trichilemmali nello spessore del derma

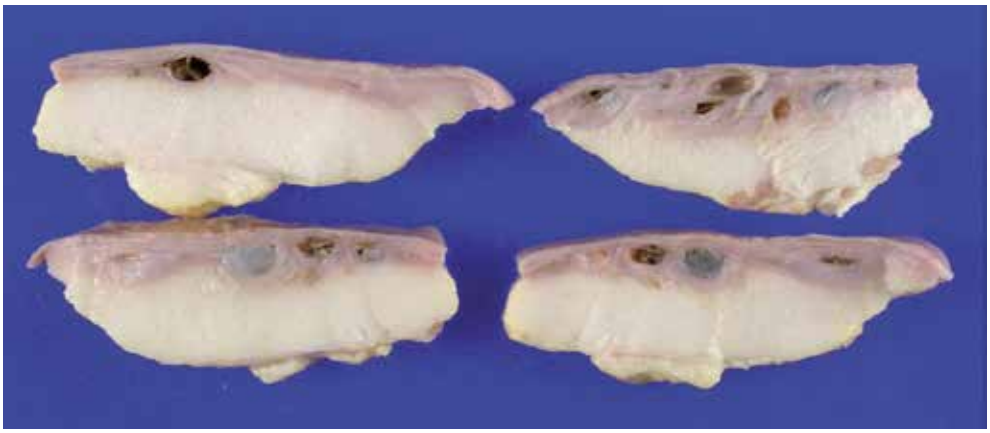


Fig. 3. Suino. Cute. Sezioni trasversali seriate. Numerose cisti trichilemmali nello spessore del derma

germente obliqua. Analogamente si potevano osservare follicoli piliferi in posizione obliqua rispetto alla cute.

Campioni di tessuto cutaneo sono stati inviati al laboratorio della Sezione di Anatomia Patologica, Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino per essere sottoposti a esame istologico.

Le indagini istopatologiche della cute dorsale hanno posto in evidenza l'assenza di bulbi piliferi in ampie zone cutanee, mentre le cavità osservate macroscopicamente contenevano del materiale cheratinizzato ormai necrotico, disposto a gomitolo in maniera disordinata e frantumato (fig. 5).

In alcune formazioni cistiche si potevano ancora intravedere nel contenuto dei residui di bulbi piliferi. Alla periferia delle cisti era presente un epitelio pluri-stratificato, simile alla guaina esterna della radice del pelo.

In base ai risultati ottenuti è stata posta la diagnosi di cisti trichilemmali associate a ipotricosi.

Considerazioni e conclusioni

Le cisti trichilemmali associate a ipotricosi sono conosciute tanto nella patologia cutanea umana (1) quanto in quella animale (4). In passato erano denominate cisti sebacee. Scarsi sono comunque i lavori in merito. Nel suino le suddette cisti si osservano solitamente sulla cute del dorso, sulla superficie interna della spalla, oppure sull'orecchio (3). Recentemente Hargis e Ginn (2) riportano che l'ipotricosi è conosciuta in molte specie animali e la forma congenita è la conseguenza di un'anomalia ereditaria per mutazione dei geni responsabili del normale sviluppo dei follicoli piliferi o di altre componenti della cute. In alcune specie è stata riconosciuta come caratteristica standard per la razza, come per esempio nel suino Ulster. Gli stessi autori sostengono che l'ipotricosi ereditaria è associata ad altri difetti quali brachignatismo, difetti di sviluppo di denti, timo e apparati genitali. La diagnosi differenziale si impone nei riguardi dell'ipotricosi provocata da altre cause, come per esempio nel suino provocata da carenza di iodio nella madre oppure da infezioni intrauterine da virus quali la peste suina classica. Sempre secondo Hargis e Ginn [2] si possono avere tre diverse forme di ipotricosi le cui

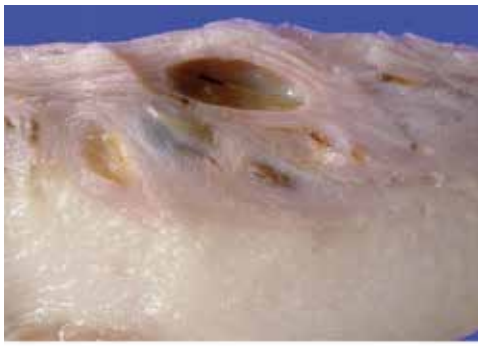


Fig. 4. Suino. Cute. Particolare della fig. 2.

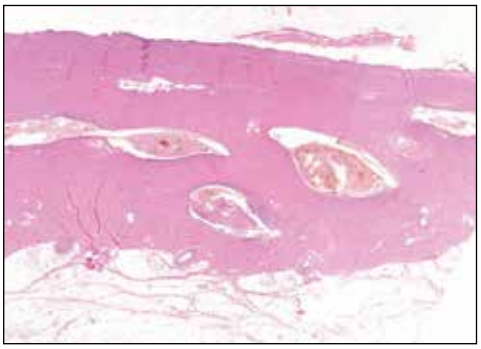


Fig. 5. Suino. Cute. Cisti trichilemmali contenenti materiale sebaceo e residui di peli (colorazione Ematossili-Eosina; picc. ingr.)

caratteristiche distintive comunque non sono assolute: 1) animali con displasia follicolare con follicoli piliferi difettosi o displasici; 2) animali con displasia follicolare associata ad alopecia o ipotricosi di origine non congenita che sviluppano tale condizione in mesi o anni dopo il parto; 3) animali con displasia follicolare senza difetti in altri organi. In base a tale classificazione, gli autori ritengono di interpretare le lesioni riscontrate in questo suino come cisti trichilemmali di origine non congenita, sviluppatesi nel corso dei mesi successivi alla nascita, di cui peraltro non si può precisare l'esatta eziologia.

Nell'uomo le cisti trichilemmali, talora in continuità con l'esterno attraverso sottili orifizi, sono più frequenti nei soggetti di sesso femminile rispetto a quelli di sesso maschile, localizzate per lo più sul volto, sul collo e sul cuoio capelluto (1), con un rivestimento epiteliale pluristratificato simile alla guaina esterna della radice del pelo.

Nella specie umana si impone una diagnosi differenziale con lesioni proliferative ad evoluzione tumorale benigna.

In conclusione l'istogenesi e la morfologia delle cisti trichilemmali del suino e dell'uomo sono simili, e possono essere temi di futuri studi per una migliore comprensione di tale patologia nell'uomo.

Bibliografia

1. Batolo D., Napoli P. Patologia cutanea: Tumori della pelle e melanomi. In Calì A. e L. Fiore-Donati (Eds): Anatomia Patologica Generale e Applicata, USES, Firenze, 1988.
2. Hargis A. M., Ginn P. F. The integument. In M. D. Mc Gavin e Zachary J. F. (Eds): Pathologic basis of veterinary disease, IV e., Mosby, St. Louis. 2007: pp. 1107-1261
3. Schuppel K. F. Haut. In: Johannsen U., Kardevan A., Zendulka M. (Eds.): Lehrbuch der Speziellen Veterinarpathologie, Fischer Verlag, Jena. 1986: pp. 513-552.
4. Trautwein G. Pelztiere. In: Schulz L. C. (E.): Pathologie der Haustiere, Verlag, Jena. 1991: pp. 175-188.

CAPITOLO 3

NUOVE FRONTIERE DELLA RICERCA SUI MODELLI ANIMALI IN FISIOLOGIA E PATOLOGIA COMPARATA

PREMESSA

Anche se i lavori inclusi in questo capitolo non rispettano, a stretto rigore di termini, il tema generale di questo libro, gli Editors hanno deciso di includerli ugualmente per il loro valore scientifico, quali particolari contributi che rappresentano una premessa e un ponte tra le ricerche attuali e quelle che, in un futuro prossimo, rappresenteranno un importante avanzamento nella ricerca sui modelli animali geneticamente modificati.

QUALE NASO PER LA SICUREZZA ALIMENTARE?
YOU CAN TEACH A DOG NEW TRICKS

FEDERICA CHELI, VITTORIO DELL'ORTO

Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano

Introduzione

È una pratica da tempo nota quella di sfruttare le capacità olfattive del cane per la ricerca e l'individuazione di persone, acceleranti, stupefacenti, esplosivi, tartufi, ecc. Più recenti sono le evidenze dell'impiego di cani come strumento diagnostico per applicazioni mediche. E' possibile quindi pensare anche a un loro utilizzo nella diagnostica alimentare?

Odore e sicurezza alimentare

Sicurezza alimentare e qualità degli alimenti, aspetti che riguardano direttamente la salute umana e lo sviluppo sostenibile di un Paese, hanno ricevuto una speciale attenzione da parte degli enti governativi, della comunità scientifica, dell'industria alimentare e del consumatore.

La valutazione di un prodotto alimentare, in termini di caratteristiche morfologiche, colore, odore e sapore, viene spesso trascurata, ma contiene nel suo complesso moltissime informazioni direttamente correlate alle caratteristiche di sicurezza, nonché di qualità tecnologica del prodotto. In particolare, l'odore e l'aroma di un alimento sono dovuti alla presenza di un preciso profilo di composti organici volatili (VOCs) che conferisce caratteristiche e qualità uniche e che può essere utilizzato come marker diagnostico di sicurezza e qualità.

L'applicazione pratica del naso umano come strumento di valutazione dell'odore di un prodotto è fortemente limitata dal fatto che il nostro olfatto è personale, accurato ma poco sensibile, si *stanca* facilmente ed è quindi difficile da utilizzare come strumento diagnostico. Visto il crescente interesse e la necessità di valutazioni *in situ* semplici e veloci o per il monitoraggio costante della sicurezza alimentare, l'utilizzo di nasi più sensibili (cane) o lo sviluppo di diversi sistemi sensoriali rappresentano strumenti importanti per l'industria agroalimentare (fig. 1).

VOCs e sicurezza alimentare

I VOCs sono una serie di composti chimici a base di carbonio che si trovano sotto forma di vapore o in forma liquida, ma in grado di evaporare facilmente a temperatura e pressione ambiente. La loro presenza può essere facilmente percepibile per il caratteristico odore che emanano anche a bassa concentrazione. VOCs sono prodotti da piante, microrganismi, animali e da alcune attività antropiche.

Il profilo dei VOCs è responsabile del profumo o odore di un alimento. La presenza di contaminanti (muffe, batteri, tossine e micotossine) è associata allo sviluppo di VOCs responsabili di odori non gradevoli, off-flavour, quali alcoli, aldeidi, chetoni ed esteri, che possono essere utilizzati come marker diagnostici per la valutazione della sicurezza alimentare (Cheli *et al*., 2016). Pertanto, per ogni campione, il profilo dei VOCs costituisce una specifica e

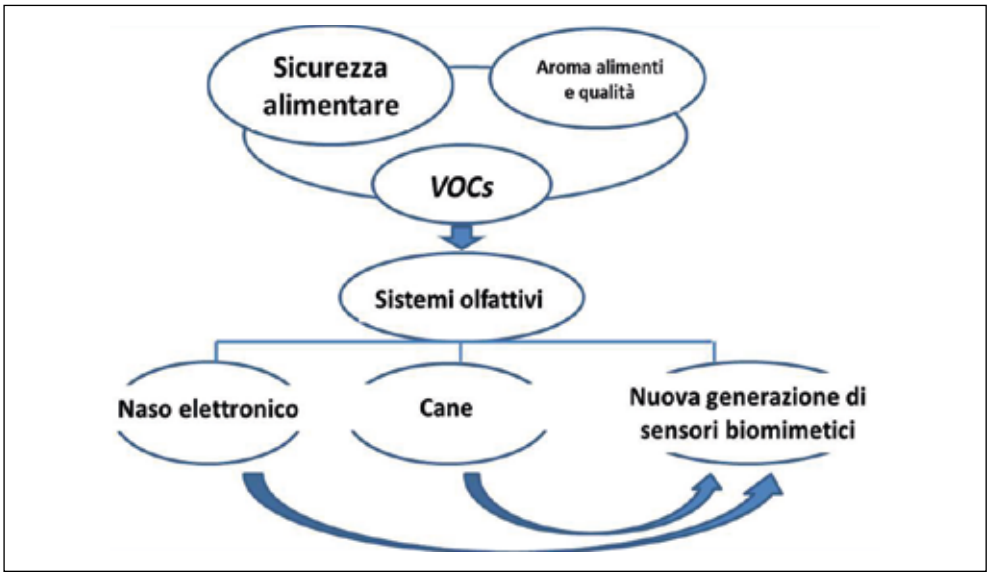


Figura 1. Quale naso per la sicurezza alimentare? (modificato da Sankaran *et al*., 2012)

unica "impronta olfattiva", contenente bio-marcatori importanti e corrispondenti bio-informazioni, che rappresenta uno strumento diagnostico di sicurezza degli alimenti (fig. 2). Non va dimenticato che, oltre alla presenza di contaminanti, altri fattori determinano una modifica del profilo dei VOCs nei prodotti alimentari, quali l'origine di un prodotto, la conservazione, i processi tecnologici, ecc.

Approcci analitici all'analisi dei VOCs

L'approccio strumentale convenzionale nell'analisi dell'aroma di un prodotto è costituito dall'analisi in gas-cromatografia-spettrometria di massa (GC–MS). Quest'analisi è in grado di identificare e quantificare i singoli VOCs, ma è molto complessa e non applicabile come strumento diagnostico rapido. Con il crescente interesse per la sicurezza alimentare, le piattaforme di sensori efficaci per una valutazione *in situ* semplice e veloce della qualità dei prodotti ali-

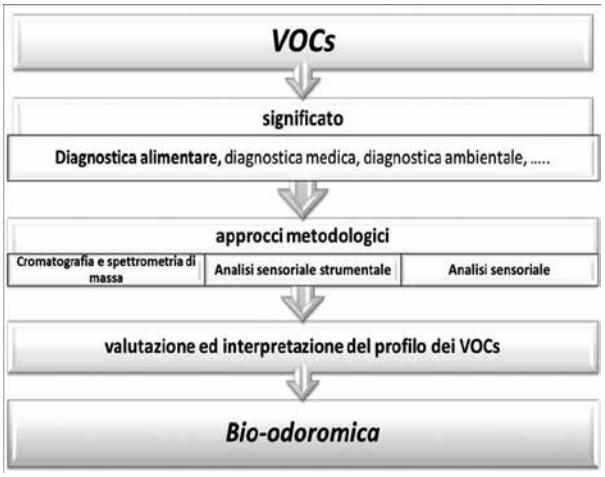


Figura 2. Sicurezza alimentare: dall'analisi dei VOCs alla bio-odoromica (modificato da Zhang *et al*., 2013)

Figura 3. VOCs per la sicurezza alimentare: sistemi biologici e artificiali per il processo decisionale (modificato da Ghasemi-Varnamkhasti *et al*., 2010)

mentari è stata oggetto di grande attenzione. La struttura dei sistemi sensoriali dei vertebrati, in particolare l'olfatto, è alla base dello sviluppo delle tecnologie dei sensori da applicare nell'ambito dell'industria agro-alimentare per il controllo degli alimenti. Questi sistemi (naso elettronico) ripercorrono il processo di acquisizione e di rielaborazione delle proprietà organolettiche di un prodotto fino alla decisione finale sulla sicurezza del prodotto stesso (fig. 3).

Il naso elettronico

Il concetto di olfatto artificiale è stato introdotto nel 1982 da Persaud e Dodd. Oggi il suo primo "naso elettronico" si può vedere esposto al Museo della Scienza di Londra. Gardner e Bartlett (1994) hanno per primi definito il naso elettronico come "uno strumento costituito da un gruppo di sensori elettro-chimici con parziale specificità e da un sistema di riconoscimento appropriato in grado di riconoscere odori semplici e complessi" (fig. 4).

Il naso elettronico, tramite l'analisi del profilo dei VOCs, permette di fornire indicazioni in tempo reale e con l'oggettività di una risposta strumentale. Il naso elettronico non distingue ciascun VOC, ma esprime l'odore globale di un prodotto, fornendo un segnale elettrico che può essere utilizzato efficacemente come una "impronta olfattiva" dei VOCs associati al prodotto, impronta che può essere utilizzata per classificare un prodotto in base ad uno specifico parametro di sicurezza e/o qualità.

Nel settore agro-alimentare, numerose sono le applicazioni del naso elettronico nell'ambito dell'analisi di qualità e sicurezza di un prodotto: qualità organolettica, freschezza e shelf life, adulterazione, presenza di contaminanti, discriminazione dell'origine geografica, discriminazione di diverse tipologie di prodotti (vino, olio, tè) (Loutfi *et al*., 2015). In termini di sicurezza alimentare, nell'ambito delle applicazioni nella valutazione della contaminazione

dei cereali con micotossine per le quali esistono dei livelli massimi ammissibili fissati dalle normative, il naso elettronico può rappresentare un valido strumento di screening che permette un'analisi qualitativa (Sì/No). Il naso elettronico è risultato in grado di discriminare campioni contaminati e non con fumonisina, aflatossine e ocratossine. L'utilizzo di opportuni modelli chemiometrici applicati all'analisi con il naso elettronico ha permesso di ottenere una valutazione semi-quantitativa della presenza di micotossine. Nel caso del deossinivalenolo (DON) in campioni di frumento duro, è stata ottenuta una netta separazione tra classi di campioni in relazione all'assenza e presenza di DON al di sotto o al di sopra dei limiti normativi (Campagnoli *et al*., 2011).

Nonostante i vantaggi dell'analisi con il naso elettronico, poche sono ancora le applicazioni a livello industriale come strumento diagnostico per le analisi di routine. Ciò può essere attribuito alla necessità di ottimizzare sia il software e/o hardware per una specifica applicazione. Pertanto, le future ricerche dovranno affrontare diverse sfide riguardanti i materiali (nuovi materiali per una migliore selettività, progettazione e sviluppo di nuovi sensori), l'analisi dei dati (migliore modellazione e correlazione tra i bio-marcatori e la risposta dei sensori, nuovi modelli chemometrici, reti neurali) e le esigenze dell'industria (controllo e monitoraggio del prodotto/processo).

Il cane per la sicurezza e qualità alimentare

L'olfatto è il senso primario di un cane. La capacità olfattiva di un cane è mille volte più sensibile di quella degli esseri umani (fino a 100.000 volte più sensibile e in grado di rilevare odori in parti per trilione). Nel cane, la superficie dell'epitelio sensoriale è pari a 150 cm^2 con 250 milioni di cellule olfattive (Sjaastad *et al*., 2010). A livello cerebrale, la porzione utilizzata per la rielaborazione degli odori è, in proporzione, 40 volte più grande di quella dell'uomo.

È una pratica da tempo nota quella dell'utilizzo di cani quale valido strumento di rilevazione di odori (VOCs) di diversa natura non biologica (acceleranti, stupefacenti, esplosivi, inquinamento) o biologica (batteri, muffe, persone, cancro, diabete) (Johnen *et al*., 2013). L'uso di cani come uno strumento diagnostico per applicazioni mediche e biologiche sta diventando sempre più importante ed una promettente alternativa a strumenti tecnici diagnostici tradizionali. In tal senso, la possibilità di sfruttare le capacità olfattive del cane anche come stru-

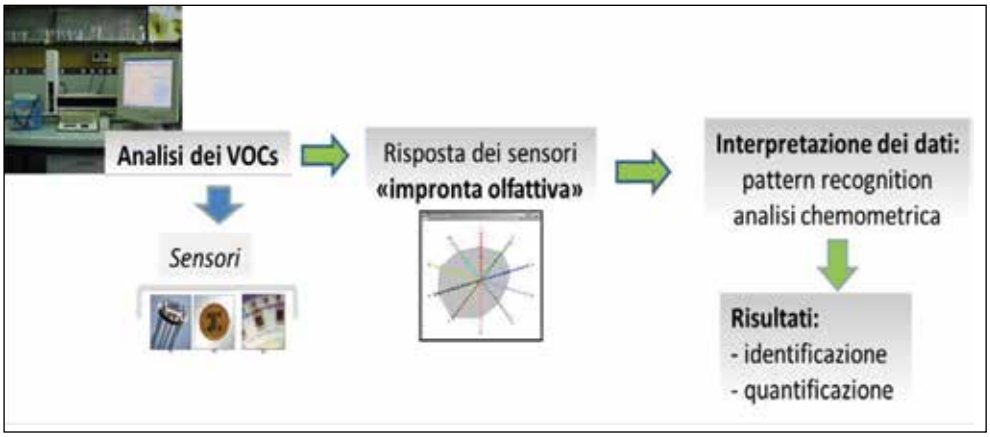


Figura 4. Naso elettronico: il processo di analisi

Che cosa si sa?	– L'odore di un prodotto alimentare può essere utilizzato come marker diagnostico di sicurezza – La capacità olfattiva di un cane è mille volte più sensibile di quella degli esseri umani – Il cane può essere addestrato per il riconoscimento e la discriminazione di odori di diversa natura non biologica (acceleranti, stupefacenti, esplosivi, inquinamento) o biologica (batteri, muffe, persone, cancro, diabete) – In relazione alla tipologia di utilizzo, ci sono grosse differenze tra animali, razze, addestratore e sistemi di addestramento
Quali sono le evidenze più recenti?	– La capacità olfattiva di un cane è ancora superiore rispetto ai sistemi olfattivi artificiali (naso elettronico) in termini di selettività e sensibilità – I livelli di accuratezza del cane in termini di discriminazione tra un singolo odore e un pool di odori contenenti tracce del singolo odore sono da valutare attentamente – Sono in fase di sviluppo sistemi olfattivi biomimetici che simulano la risposta del sistema olfattivo del cane in termini di sensibilità e selettività di specifici marcatori dell'ossidazione degli alimenti
Cosa sviluppare per un elevato impatto in termini di sicurezza alimentare?	– Identificazione di profili di VOCs specifici da utilizzare come biomarcatori diagnostici della sicurezza alimentare – Messa a punto di programmi di addestramento specifici per i cani in termini di riconoscimento di odori legati a problematiche di sicurezza alimentare – Valutazione delle performance del cane in termini di capacità discriminante specifica in relazione alla problematica di sicurezza alimentare – Ulteriore sviluppo di piattaforme con array di sensori biomimetici in un singolo chip che simulano la risposta del sistema olfattivo del cane in relazione a specifiche problematiche di sicurezza alimentare

Tabella 1. Il cane per la sicurezza alimentare.

mento diagnostico rapido *in situ* per la valutazione della sicurezza alimentare rappresentano un'interessante tematica di ricerca (tabella 1). L'utilizzo di cani addestrati in tal senso potrebbe rappresentare un enorme vantaggio per la rilevazione di contaminanti presenti in tracce e distribuiti in modo non uniforme in un prodotto la cui ricerca e analisi strumentale richiede una complessa procedura di campionamento (p.es. micotossine in grandi partite di cereali).

Le normative nel campo della sicurezza alimentare impongono limiti massimi ammissibili per i diversi contaminanti o sostanze indesiderate. Pertanto, al fine di poter utilizzare i cani come uno strumento diagnostico per la sicurezza alimentare, alternativo a quello strumentale, sarà necessario, oltre allo sviluppo di metodi di addestramento specifici, valutare le performance del cane in termini di capacità di riconoscimento e discriminazione (presenza/assenza, presenza al di sopra/sotto limiti normativi) specifiche in relazione alla problematica di sicurezza alimentare per consentire raffronti validi dei risultati.

La capacità olfattiva di un cane è ancora superiore rispetto ai sistemi olfattivi artificiali (naso elettronico) in termini di selettività e sensibilità. Lo sviluppo delle conoscenze del sistema e dei meccanismi molecolari dell'olfatto del cane ha permesso di sviluppare una nuova generazione di sensori biomimetici che integrano componenti del sistema olfattivo animale quali recettori olfattivi e molecole leganti odori per il riconoscimento di diversi VOCs. Questi sensori potranno sostituire i sensori chimici al momento utilizzati nei nasi elettronici commerciali, e potranno essere utilizzati per lo sviluppo di nasi bio-elettronici caratterizzati da una più elevata sensibilità e selettività.

Bibliografia

- Campagnoli A., Cheli F., Polidori C., Zaninelli M., Zecca O., Savoini G., Pinotti L., Dell'Orto V. (2011). Use of the electronic nose as a screening tool for the recognition of durum wheat naturally contaminated by deoxynivalenol: a preliminary approach. Sensors 11, 4899-4916.
- Cheli F., Pinotti L., Ottoboni M., Tretola M., Dell'Orto V. (2016). Cereal Industry: e-Nose for Real Time and Online Quality and Safety Control and Management. Sensors & Transducers 201, 52-58.
- Gardner J.W., Bartlett P. N. (1994). A brief history of electronic noses, Sensors Actuators B: Chemical 18, 210-211.
- Ghasemi-Varnamkhasti M., Mohtasebi S.S., Siadat M. (2010). Biomimetic-based odor and taste sensing systems to food quality and safety characterization: An overview on basic principles and recent achievements. J. Food Eng. 100, 377-387.
- Johnen D., Heuwieser W., Fischer-Tenhagen C. (2013). Canine scent detection - fact or fiction? Appl. Anim. Behav. Sci. 148, 201-208.
- Loutfi A., Coradeschi S., Mani G.K., Shankar P. (2015). Electronic noses for food quality: A review. J.Food Eng. 144, 103-111.
- Sankaran S., Khot L.R., Panigrahi S. (2012). Biology and applications of olfactory sensing system: A review. Sensors and Actuators B 171-172, 1-17.
- Sjaastad Ø.V., Sand O., Hove K. (2010). Physiology of Domestic Animals. 2nd edition. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. 804 pp.
- Zhang Z., Ma Y., Li G. (2013). Progress on the analytical methodology for biological volatile organic compounds Anal. Methods 5, 20-29.

European Heart Journal (2015) **36**, 837–846
doi:10.1093/eurheartj/ehu493

REVIEW

Frontiers in cardiovascular medicine

The research venture in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a paradigm of translational medicine†

Gaetano Thiene*

University of Padua Medical School, Padua, Italy

Received 31 October 2014; revised 1 December 2014; accepted 11 December 2014; online publish-ahead-of-print 30 January 2015

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy is a recent discovery in the field of non-ischaemic myocardial diseases. It represents a unique example on how it is possible in few years to move from the identification of a new lethal morbid entity at the anatomical theatre towards the unveiling of the genetic aetiology, thus allowing early detection of carriers with effective strategies for premature death prevention.

Keywords Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy • Genetics • Pathology • Sudden death

Downloaded from by guest on July 3, 2015

Introduction

I feel particularly honoured that my lecture is dedicated to the memory of René Laennec (*Figure 1*). He invented the stethoscope[1] on the base of clinico-pathologic correlations, employing the method introduced in my University by Giovanni Battista Morgagni, the discoverer of organ pathology.[2]

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a recent discovery in the field of non-ischaemic myocardial diseases. It represents a unique example on how it is possible in few years to move from the identification of a new lethal morbid entity at the anatomical theatre towards the unveiling of the genetic aetiology, thus allowing early detection of carriers with effective strategies for premature death prevention.

I took part to this venture since the beginning and I would like to tell this journey, which is really a paradigmatic instance of translation in Cardiovascular Medicine.[3]

History of the disease

First descriptions of ARVC date back centuries ago, much earlier than modern observations.

The first report of ARVC as heredo-familial disease was published posthumously in 1736 by Giovanni Maria Lancisi. In the book entitled *De Motu Cordis et Aneurysmatibus*, Caput V, *De Hereditaria ad Cordis Aneurysmata Constitutione: De Cordis Prolapse* (an hereditary predisposition to cardiac aneurysm and bulgings) he described the history of a family with disease recurrence in four generations, presenting with palpitations, dilatation and aneurysms of the RV, heart failure and sudden death.[4]

The first detailed pathological description was made by the same Laennec in his book '*De l'auscultation médiate ou traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur*'.[1] *In chapter* XV on the accumulation of fat about the heart, he wrote 'In medical writing we find many examples of the heart being overloaded with fat [. . .] and even the sudden death [. . .] The fatter the heart is, the thinner [. . .] are its walls. Sometimes these are extremely thin, being reduced almost to nothing, especially at the apex of the heart and the posterior side of the right ventricle. [. . .] On examining ventricles [. . .] the scalpel seems to reach the cavity without encountering almost any muscular substance [. . .]'.

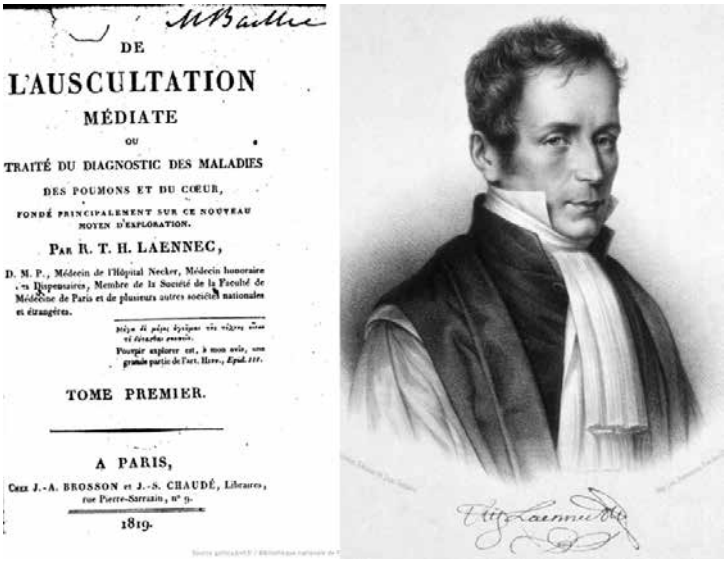
This is confirmed by the protagonist Dr Lydate in Middlemarch of George Eliot, published in 1871, who, while talking to his patient, said 'You are suffering from what is called fatty degeneration of the heart, a disease which was first described by Laennec. . . it is my duty to tell you that death from the disease is often sudden. . .'.[5]

William Osler reported a case of 40 years old man who died suddenly while climbing up to a hill.[6] The heart specimen, which is now

* Corresponding author. Email: gaetano.thiene@unipd.it

† Presented at 'René Laennec' Lecture on Clinical Cardiology, ESC Congress, Barcelona, 31 August 2014.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2015. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.


DE

L'AUSCULTATION

MÉDIATE

OU

TRAITÉ DU DIAGNOSTIC DES MALADIES

DES POUMONS ET DU CŒUR,

FONDÉ PRINCIPALEMENT SUR CE NOUVEAU MOYEN D'EXPLORATION.

PAR R. T. H. LAENNEC,

TOME PREMIER.

A PARIS,

CHEZ J.-A. BROSSON ET J.-S. CHAUDÉ, Libraires,

1819.

Figure 1 René Laennec and his book published in Paris in 1819.

part of the Abbot Collection in Montreal and was reviewed by Segall,[7] disclosed a biventricular massive myocardial atrophy, which Osler had named 'parchment heart'.

The case observed by Uhl at the Johns Hopkins Hospital in Baltimore and published in 1952[8] is still controversial and a source of misconceptions. It dealt with an 8-month old female infant with 'almost total absence of myocardium in the right ventricle in the absence of fatty tissue', who died due to congestive heart failure without arrhythmias. 'Examination of the cut edge of the ventricle wall reveals it to be paper-thin with no myocardium visible. . .', clearly a congenital absence as emphasized in the title itself.[8] The eponym Uhl's anomaly has been employed also in adult with parchment RV free wall, clearly a misnomer since the papyraceus appearance of the ventricles in adults is the end stage of an acquired progressive, genetically determined loss of the myocardium. The parchment heart patients, reported then in the literature as Uhl's anomaly, were 17 to 81 years old and died either by congestive heart failure or arrhythmic cardiac arrest like the Osler patient.[9] Obviously the infant reported by Uhl was affected by a structural defect present at birth, i.e. a congenital heart disease. We cannot exclude that myocardial loss could have occurred in the fetal life.

The research venture in Padua started in the 60's when Professor Sergio Dalla Volta, the founder of the modern cardiology at our University, published cases with 'auricularization of the right ventricle' to emphasize the hemodynamic dysfunction, namely the absence of an effective systolic contraction of the RV with the blood pushed from the right atrium to the pulmonary artery.[10,11] Dalla Volta concentrated the attention to hemodynamic features, although ventricular arrhythmias were also present. Thirty years later, one of these patients underwent cardiac transplantation at the age of 65, presenting with parchment like RV and still intact left ventricle.[3]

When I was still in training, my mentor in Pathology Professor Vito Terribile performed an autopsy of a woman with a history of palpitations and congestive heart failure, who died of pulmonary thromboembolism. The heart showed a severe dilatation of the RV with mural thrombosis, 'adipositas cordis' and fibrosis of the left ventricular free wall, in keeping with biventricular ARVC (*Figure 2*).

The arrhythmic features of the disease were discovered by Guy Fontaine in the '70 s, by demonstrating the origin of non-ischemic ventricular tachyarrhythmias from the RV with left bundle branch block morphology.[12] He observed a delayed repolarization at the end of the QRS complex (post-excitation syndrome), which he named epsilon wave.[13]

Knowledge on the disease made progress in Padua thanks to Andrea Nava, a true pioneer and leader of our group, of whom I have been a pupil during my fellowship in Cardiology. Nava was the one to realize the heredo-familiar nature of the disease with a mendelian dominant transmission[14] and to demonstrate the onset of phenotype in childhood.[15] Meanwhile, Marcus and Fontaine, by reporting a series of adult patients with ventricular arrhythmias and left bundle branch block morphology, in keeping with origin from RV, introduced the term 'dysplasia' because the bizarre histologic features of the myocardium at histology, which they considered a maldevelopmental defect.[16] The term was then abandoned and ARVC

Downloaded from by guest on July 3, 2015

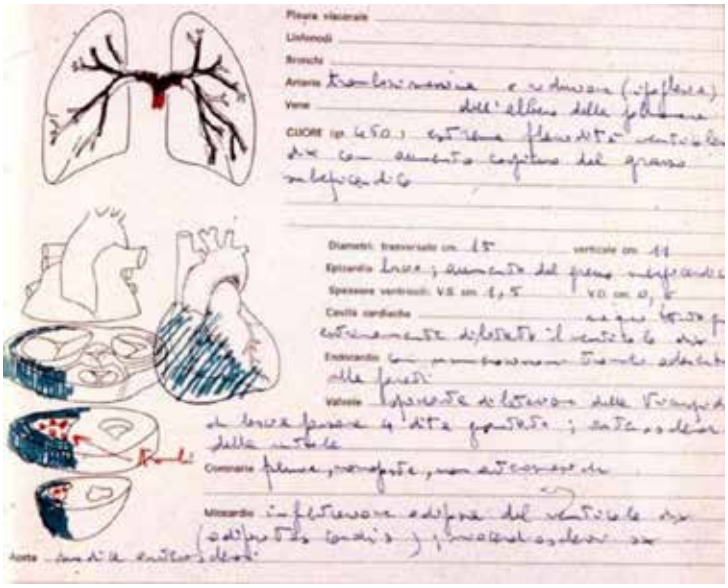


Figure 2 The autopsy record of a female patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, first postmortem case studied at the University of Padua. Note the '*adipositas cordis*' in the right ventricle and the '*myocardial sclerosis*' in the left ventricle.

Downloaded from by guest on July 3, 2015

introduced definitively in the WHO nomenclature and classification of cardiomyopathies.[17]

ARVC is a cause of sudden cardiac death in the young: pathology

At the late '70s we started a research program, collecting and studying all the cases of juvenile sudden cardiac death (SCD) (<35 years, sudden infant death syndrome excluded) occurring in the Veneto Region, a northern-east part of Italy with nearly 5 million inhabitants. We were able to cover the whole phenomenon, thanks to the collaboration of forensic and anatomic pathologists. The project is still ongoing and has no equivalent worldwide, since all the hearts are forwarded to our Pathology Core Lab. Among the first 60 consecutive cases, 12 (20%) were found to be affected by ARVC and most of them were athletes. Thanks to the availability of the ECG, which is compulsory in Italy for eligibility to sport activity, it was possible to realize that the subjects presented inverted T-wave in the right precordial leads and apparently benign premature ventricular beats of the left bundle branch block morphology (*Figure 3*). The paper was published in the *New England Journal of Medicine* on a January issue 1988.[18] It was a shock for the scientific cardiovascular medicine community to realize that not only hypertrophic cardiomyopathy is a cause of sudden death in the young and athletes.[19] Genetic variability or, more probably, misdiagnosis at postmortem may have accounted for the discrepancy of the prevalence in United States vs. Italy. As usual, you see what you know.

Pathology was then reported in detail.[20] The phenomenon consists of a transmural fibro-fatty replacement in the RV wall, with aneurysms in 50% of cases, located in the inferior, apical and infundibular regions ('triangle of dysplasia'). The disease could be segmental and equally malignant. Left ventricular free wall involvement was observed in nearly half of the cases (*Figure 4*), whereas location in the ventricular septum was rare. Even hearts with isolated left ventricular involvement were reported, thus the term arrhythmogenic cardiomyopathy was advanced.[21] A glance at the light microscope allowed to see cell death, followed by fibro-fatty infiltration. This observation was in keeping with an ongoing myocardial injury and repair phenomenon and with a genetically determined cardiomyopathy characterized by an acquired, progressive loss of myocardium with fibro-fatty scarring, well in agreement with the concept of myocardial dystrophy[9,20] (*Figure 5*). At electron microscopy and Tunel staining, apoptosis appeared to be the mode of the ongoing myocyte death.[22]

Focal myocardial inflammation was observed in about 75% of autopsy cases and might account for worsening of electrical instability and onset of life-threatening arrhythmias.[20,23,24] Whether the inflammatory cells are a reaction to cell death or the consequence

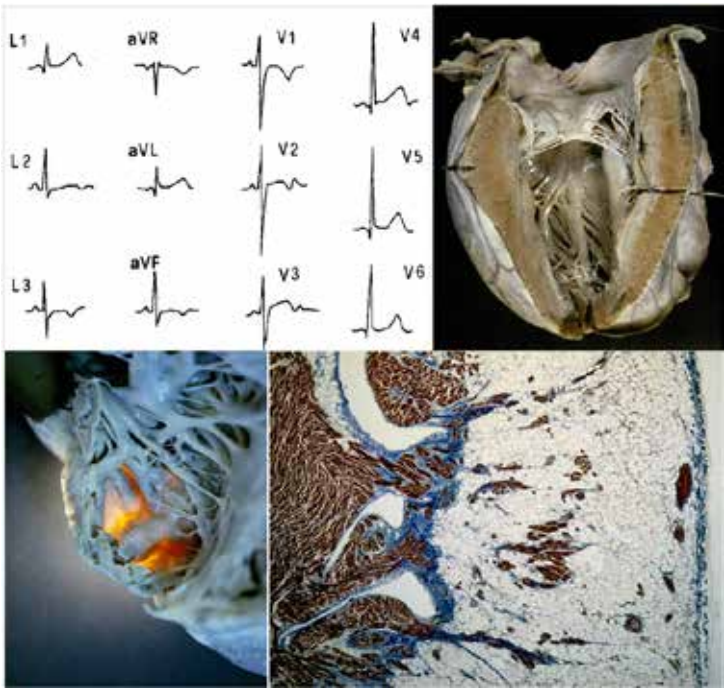


Figure 3 A 30-year-old athlete who died suddenly during a soccer game: note the inverted T waves in the right precordial leads. At postmortem, the left ventricle was normal, whereas the right ventricle showed fibro-fatty replacement of the free wall with inferior aneurysm.

of infective or immune mechanisms has been a source of controversy. Superimposed viral infections were ruled out by molecular investigations.[25]

Concerning the more prominent pathology of the RV, mechanical stress is the most plausible explanation for. The RV cavity is larger and the free wall thinner than the left ventricle. According to Laplace's law, wall tension is particularly high in the RV free wall and a role of mechano-transduction has been postulated to convert mechanical stimuli to biochemical intracellular signals,[26,27] especially in the setting of genetically determined fragility of the intercellular junctions.

Another explanation involves the origin of the adipocytes from progenitor cells of the second heart field, which give rise to the bulbus cordis and pulmonary infundibulum. According to this hypothesis, the progenitor cells of the second heart field switch to adipogenesis because of suppressed wnt–catenin β_1 signalling as a result of the translocation of junction plakoglobin to the nucleus.[28]

Because ARVC is now considered to be a biventricular disease, subepicardial progenitor cells are more likely than those from the second heart field to have a role in fibrofatty replacement. Indeed, subepicardial progenitor cells spread into both ventricles, and generate the myocardium and interstitial cells. The wave-front extension of the fibrofatty tissue from the epicardium towards the endocardium supports this alternative theory.[29]

ARVC is a genetically determined cardiomyopathy: desmosomal disease

In the '90s we had no idea where to look for the gene mutations. Certainly neither into sarcomeric genes, like in hypertrophic cardiomyopathy, since there was no evidence of hypertrophy or disarray, not into cytoskeleton dystrophin complex ones, like in dilated cardiomyopathy, since mechanical contractility was fairly preserved in the left ventricle. The inspiration came from a letter to the Editor submitted to the New England, following the publication of our paper,[18] by a group of Greek scholars from the Naxos island.[30] They drew readers' attention to the existence of a recessive cardiocutaneous syndrome, combining ARVC phenotype and palmoplantar keratosis with woolly hair.[31] Since both epidermal cells and myocytes possess desmosomes, ensuring mechanical adherence, genes coding proteins of cell junctions became candidate.

Downloaded from by guest on July 3, 2015

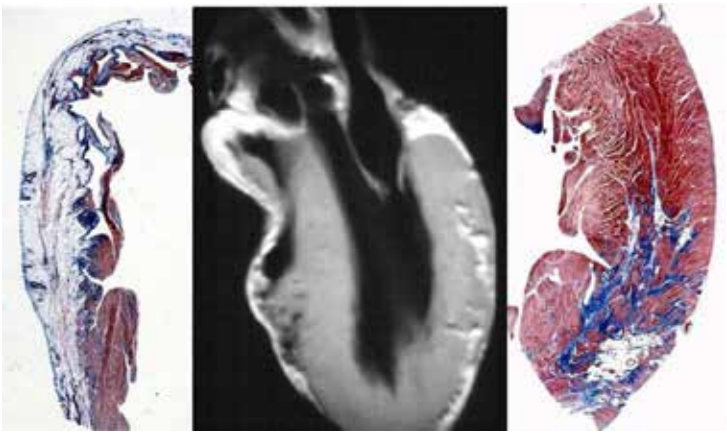


Figure 4 A 14-year-old boy died suddenly during a soccer game: at postmortem, including magnetic resonance, biventricular fibro-fatty replacement was observed.

A German group from Heidelberg showed that knock out transgenic mice of the JUP (plakoglobin) gene (y-catenin) resulted in severe myocardial injury with disappearance of desmosomes and spontaneous fetal cardiac rupture. 'The human plakoglobin gene is located on chromosome 17q21, a region not yet identified in human cardiomyopathy patients' they said.[32]

Thus, JUP became a candidate gene for the Naxos disease. Linkage analysis was carried out in Naxos affected families, identifying the gene defect exactly in the locus 17q21[33]. Thereafter it was proved through gene sequencing that the molecular defect was a deletion in plakoglobin gene.[34]

In the late '90s Luis Carvajal Huerta, a dermatologist from Equador, had reported another recessive cardio-cutaneous syndrome, featured by dilated cardiomyopathy, woolly hair and palmoplantar keratosis.[35] The defect was found in DSP (desmoplakin) gene, encoding a major protein of the desmosome apparatus.[36] By studying with Jeff Saffitz in St Louis the heart specimen of one original child with Carvajal syndrome, who had died with congestive heart failure, I realized that it was undoubtfully a biventricular ARVC, with aneurysms in the RV, typically located in the triangle of dysplasia, and with extensive dilatation of the left ventricle with mural thrombosis.[37]

This experience was inspiring in so far as DSP immediately became a candidate gene also for the dominant variant of ARVC. The genetic screening of families, followed-up by Nava in Padua, led to the identification of a missense mutation of DSP gene.[38] Genotype-phenotype correlations demonstrated that *in vivo* imaging by cardiac magnetic resonance of genotyped DSP patients have frequently a biventricular or even predominant left ventricular involvement.[39]

All the other genes encoding desmosomal proteins were soon investigated in non syndromic ARVC and missense mutation in PKP2 (plakophillin-2),[40] DSG2 (desmoglein-2),[41] DSC2 (desmocollin-2)[42,43] were discovered. Thus, both recessive and dominant variant of ARVC were attributed to cell junction defects and the disease overall named desmosomal disease[44,45] (*Figure 6*).

Figure 5 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy is a progressive myocardial dystrophy. From Basso *et al.*[29]

Electron microscopy in genotyped patients affected by ARVC revealed ultrastructural abnormalities of the desmosomes, which appeared less numerous, short, pale, fragmentary, and we postulated that disruption of intercalated disc might be the final common pathway of the genetically determined myocyte death.[46]

Additional non-desmosomal-related genes have been associated with ARVC, such as *RYR2* (ryanodine receptor 2),[47] *TGFB3* (transforming growth factor β_3),[48] *TMEM43* (transmembrane protein

Downloaded from by guest on July 3, 2015

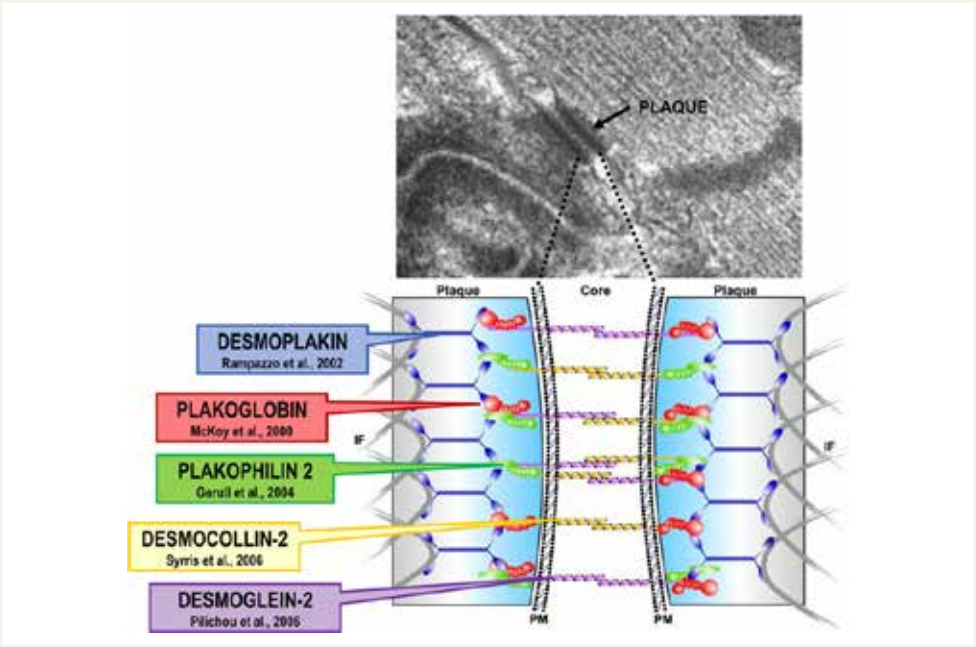


Figure 6 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy is a desmosomal disease, namely a disease of the intercellular junction.

43),[49] *CTNNA3* (alfa-T catenin),[50] TTN (titin),[51] *DES* (desmin),[52] and *PLN* (phospholamban).[53] While the last three genes are causing ARVC overlap syndromes, *RyR2* was eventually related to a distinct clinical entity (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia), a ion channel disease in the absence of a substrate.[54] As far as TGFB3, it is a source of controversy as disease causing gene, being quite rare and not confirmed by subsequent studies.

Recapitulation of the disease in transgenic mice

We generated, in collaboration with Professor Bezzina in Amsterdam, a transgenic mouse overexpressing in the heart the mouse homologue of a desmoglein-2 gene mutation, previously identified in Padua in an ARVC proband who underwent cardiac transplantation for severe RV dilatation.[55]

The findings of the recapitulated disease in mice were astonishing: dilatation and aneurysm formation at both ventricles with fibrous replacement of the myocardium, prolonged ventricular activation at epicardial electrophysiology, tachyarrhythmias, and SCD. Oddly enough, the hearts appeared normal at birth and cell death was documented at histology and electron microscopy with features of necroptosis.[55] Necrotic myocyte death was demonstrated to be the initiating event in the myocardial injury and repair process. This was the confirmation that the disorder is a genetically determined cardiomyopathy and that the pathologic substrate occurs with time (*Figure 5*), due to a dose-dependent dominant-negative effect of the mutation.

Subsequent study in the same transgenic model revealed the occurrence of delayed electrical ventricular activation time and arrhythmias inducibility, before the onset of myocyte death and replacement fibrosis, as a consequence of reduced Na^+ current density, probably due to intercalated disc widening seen at electron microscopy.[56] In other words, ventricular electrical instability appears before structural remodelling, due to cross talk between cell junction and sodium channel complex. The evidence of an *in vivo* interaction between desmoglein-2 and sodium current underscores the functional link of electrical disturbances during the early ARVC stages.

Advances in diagnosis

Diagnostic criteria have been dictated in 1994, as to make possible identification of patients at risk through non-invasive (ECG, echo) and invasive procedures [angiography, endomyocardial biopsy (EMB)].[57] Cardiac magnetic resonance (CMR) revealed to be an extraordinary diagnostic tool in terms of both morphofunctional study (ventricular dilatation, dyskinesia, aneurysms) and tissue characterization. Although not yet included in the 2010 updated version

Downloaded from by guest on July 3, 2015

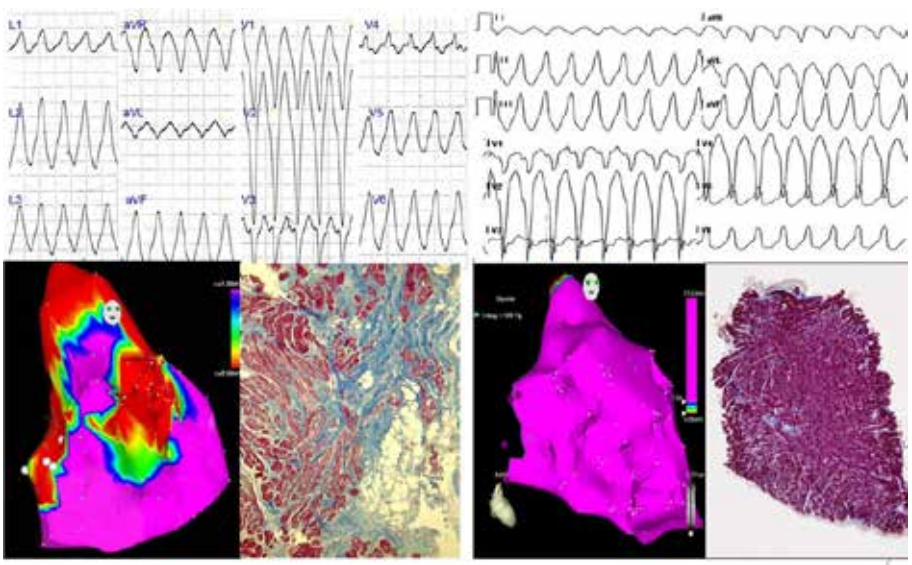


Figure 7 Electroanatomic mapping is a fundamental tool in differential diagnosis between segmental infundibular arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (left panel) and idiopathic right ventricular outflow tract tachycardia (right panel). From Corrado *et al.*[60,61]

of the diagnostic criteria,[58] contrast-enhanced CMR is now routinary employed in tertiary centres. In particular, since ARVC is frequently a biventricular disease, contrast enhanced CMR with gadolinium may easily detect fibro-fatty scarring in the LV, which can be considered the 'mirror' of RV involvement.[59] Electroanatomic voltage mapping (EVM) revealed to be a quite sensitive tool for detecting decreased electrical activity in the areas of fibro-fatty replacement and for differential diagnosis of segmental infundibular ARVC with RV outflow tract tachycardia (a ventricular arrhythmia without substrate and no genetic background) as well as myocarditis[60,61] (*Figure 7*). By the way, as far as detection of fibro-fatty scarring in RV free wall, bipolar EVM is much more sensitive than contrast-enhanced CMR due to the thin wall[59] (*Figure 8*). Recent data demonstrated that unipolar EVM recording provides a larger antenna than bipolar-EVM to accurately detect fibro-fatty substrate involvement confined to the epicardium, which commonly occurs in ARVC patients.[62] Moreover, the arrhythmic risk increases with the amount of RV myocardium replaced by electroanatomic scar. However, since also cardiac sarcoidosis may mimic ARVC, employment of EMB is sometimes needed for differential diagnosis.[63] Morphometric criteria were put forward for ARVC diagnosis at EMB[64] and were included within 2010 diagnostic criteria.[58]

Differential diagnosis with cross-over arrhythmogenic syndromes, such as Brugada syndrome and idiopathic RV outflow tract tachycardia, may be challenging.[45] While the latter condition is usually benign and non-familial, without ECG repolarisation and depolarisation abnormalities, Brugada syndrome is an inherited channelopathy presenting with a characteristic ECG morphology, i.e. coved ST-segment elevation in the right precordial leads, life-threatening ventricular arrhythmias, and high risk of SCD.[65] In both instances, the demonstration of the absence of RV structural abnormalities, including normal contrast-enhanced CMR, EVM as well as EMB findings, is of utmost value. Recent molecular studies suggest that ARVC and Brugada syndrome are not completely separate entities, but 'bookends' in a continuum of variable sodium current deficiency and structural changes, thus explaining the partial clinical overlap.[66]

Risk stratification: prevention of sudden death is possible

The application of diagnostic criteria greatly contributed to the detection of ARVC in young subjects. In particular, the observation of inverted T waves in right precordial leads,[67] QRS widening and epsilon waves at pre-participation ECG screening resulted in disqualification of athletes and sharp decline of SCD during sport activity.[68]

The discovery of the defective genes, although still limited to 50% of ARVC patients, opened new avenues. Genetic screening, for early diagnosis of healthy carriers and reassurance of non-carriers, entails a tremendous impact on life-style, including sport activity eligibility, and on genetic counselling for disease recurrence in sibs and offsprings with primary prevention of arrhythmic risk. Risk stratification for implantable cardioverter defibrillator (ICD) has been put forward,

Downloaded from by guest on July 3, 2015

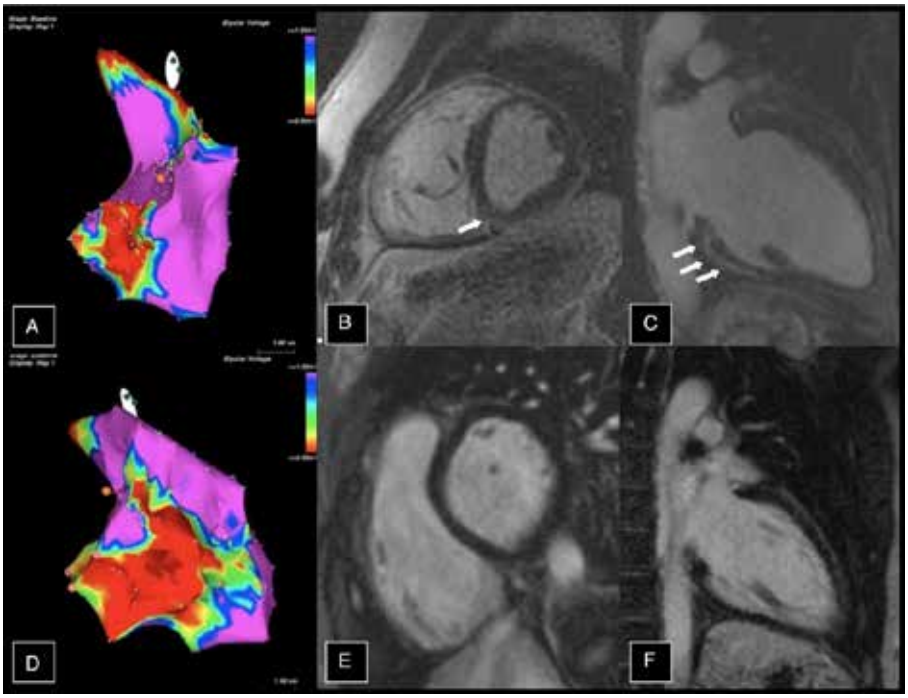


Figure 8 Electroanatomic mapping is more sensitive than cardiac magnetic resonance with late enhancement to detect right ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. However, the left ventricle is frequently involved, as to be considered the 'mirror' of the right ventricular at cardiac magnetic resonance. From Perazzolo Marra *et al.*[59]

Downloaded from by guest on July 3, 2015

most based on phenotype and clinical manifestations (previous cardiac arrest, syncope, sustained tachycardia).[69–71] Multiple compound-heterozygous mutations revealed to entail a more severe prognosis.[72] Implantable cardioverter defibrillator is a miraculous life-saving tool. 25% of patients, in whom an ICD was implanted, had an appropriate electric shock at follow-up of 4 years due to ventricular fibrillation with cardioversion to sinus rhythm, which means a clear-cut decline of mortality in the natural history of the disease[73] (*Figure 9*). Syncope should be regarded as an alarming sign for possible ICD implantation and primary prevention of SCD.[74] However, ICD is associated with complications and should be employed when strictly indicated according to a precise risk stratification[69–71] (*Figure 10*).

Treatment

There are several weapons available in the armamentarium for prevention of SCD in ARVC[26,75] (*Figure 11*). Cardiac arrest occurs accordingly to the combination of trigger and arrhythmic mechanism, acting upon the peculiar substrate of the disease. Effort and emotion act as triggers. The risk of SCD during effort in patients with ARVC is five folds than in sedentary activity.[76] Sports disqualification 'per sé' is a life-saving measure and the decline of SCD in athletes achieved in Italy, thanks to non-eligibility of subjects affected by ARVC, is a clear-cut evidence of its efficacy.[68]

Drug therapy and ablation influence the reentry arrhythmic mechanisms.[69–71] They are both of limited efficacy, in particular catheter ablation shows a high rate of arrhythmias recurrence.[77]

Defibrillator, either ICD or semi-automatic external, represents a major advancement in preventing SCD. It is the most effective life-saving tool by converting ventricular fibrillation to sinus rhythm. Implantable cardioverter defibrillator is employed according to risk stratification for both secondary (after previous episodes of aborted SCD)[73] or primary prevention (previous unexplained syncope, high familiarity of SCD with compound or heterozygous mutations)[74]. Use of semi-automatic defibrillator, made available in any sport field, together with the pre-participation ECG screening for detection and disqualification of asymptomatic carriers, represent the best synergy for prevention of SCD in athletes.

In case of heart failure or unbearable electric storms, cardiac transplantation is also available as extreme therapeutic option.[69–71]

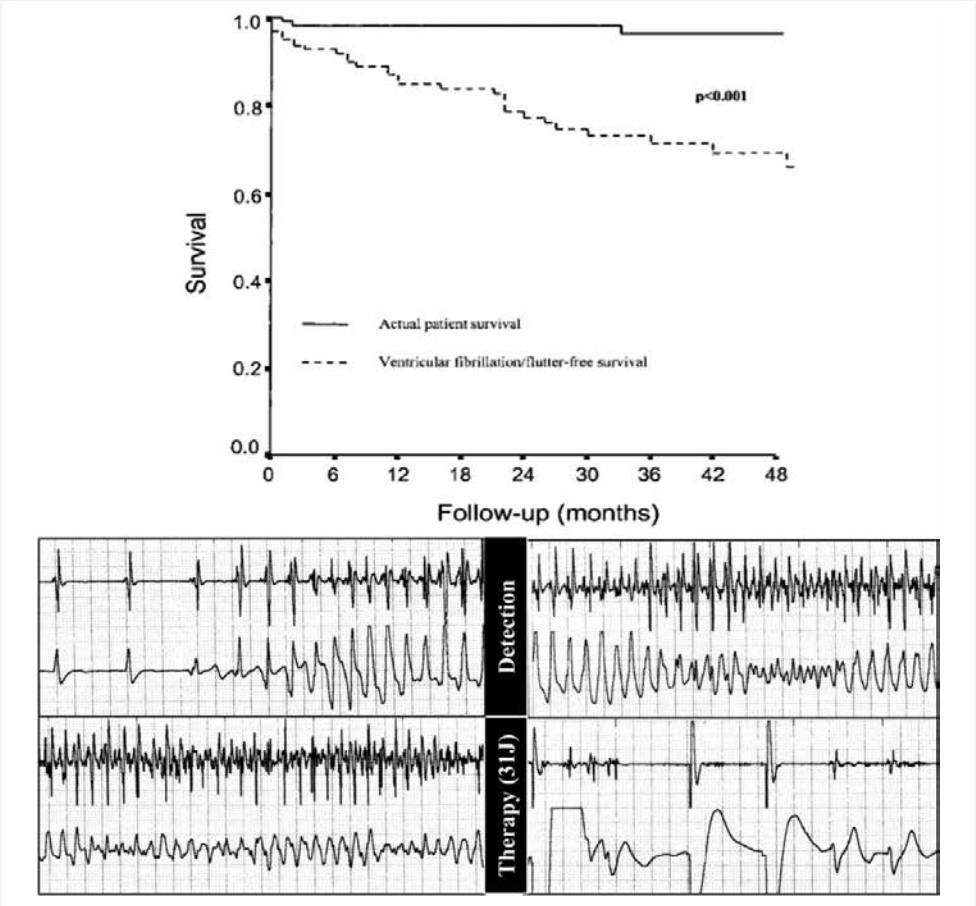


Figure 9 25% life-saving effect of implantable cardioverter defibrillator for secondary prevention within a follow-up of 4 years.

Time for molecular therapy

All the previously mentioned pharmacologic and non-pharmacologic measures are merely palliative, in so far as they act on preventing or treating arrhythmias. They do not point to the basic pathobiology mechanisms, namely the onset and progression of cell death leading to myocardial dystrophy. We look forward to the time when arrhythmias will not be the only target to manage ARVC and to prevent SCD.[75]

Cellular reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs) enables patient-specific *in vitro* modeling of human genetic disorders for pathogenic investigation and drug screening.[78] Fibroblasts from skin biopsy sample of patients may be used to generate autologous cardiomyocyte in ARVC.[79] Moreover, *in situ* reprogramming fibroblasts from the heart itself is an attractive possibility. Although so far only a small amount of reprogrammed myocytes appear beating cells, the ability to reprogram fibroblasts into cardiomyocytes could represent a revolution for the repair of fibro-fatty replacement in ARVC.[80]

Zebrafish model may be also employed in the study of ARVC, to elucidate pathogenetic mechanism and screen drug therapy. By creating a zebrafish with cardiomyocyte-specific expression of mutated plakoglobin, a suppressor (SB21673) of ARVC phenotype was found, which normalized Na or K current density, reversed protein trafficking of intercellular disc proteins and prevented heart failure with reduced mortality.[81]

Engineering adeno-associated viral vector containing c-DNA of wild-type desmosomal gene, to be transferred into the heart, may

Downloaded from by guest on July 3, 2015

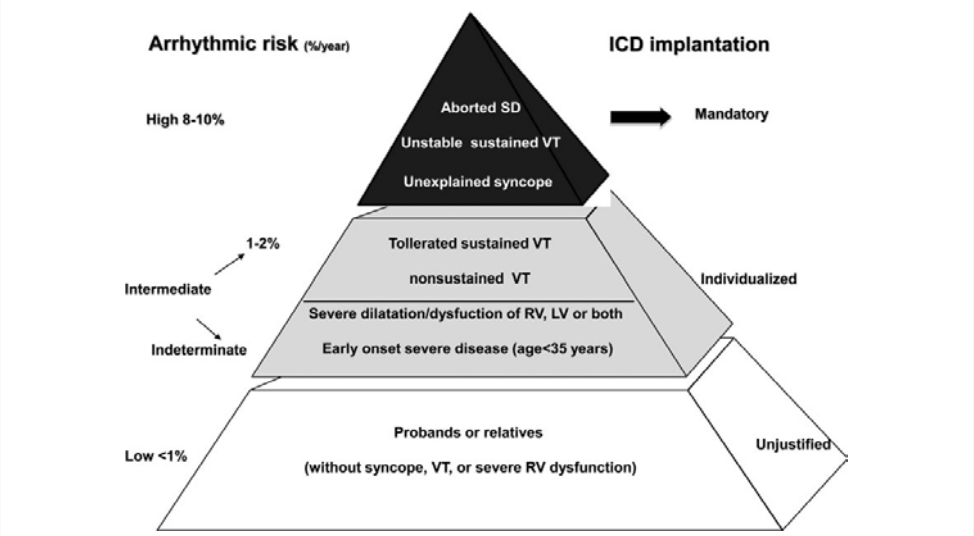


Figure 10 Implantable cardioverter defibrillator (ICD) is mandatory in patients with aborted sudden death, unstable sustained ventricular tachycardia (VT) and unexplained syncope.

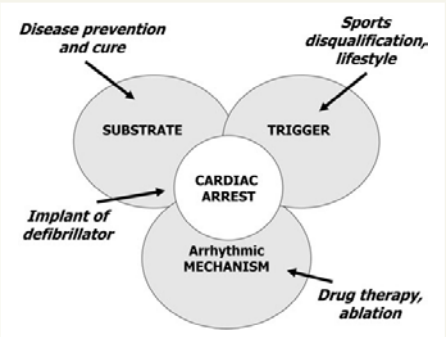


Figure 11 Cardiac arrest is the combination of trigger, substrate and arrhythmic mechanism. Sport disqualification acts on the trigger, drug therapy and ablation are palliative measures. Defibrillator clearly intervenes on the mode of cardiac arrest, namely ventricular fibrillation. The true disease prevention and cure should point to onset and progression of the substrate.

restore electrophysiological and ultrastructural abnormalities. It may represent a curative gene therapy as it has been proven in cathecolaminergic polymorphic ventricular tachycardia.[82]

We are facing new avenues and time has come that molecular medicine enters the field of myocardial dystrophy in ARVC, as it was for muscular dystrophy.[83]

Funding

This study was supported by Registry of Cardio-Cerebro-Vascular Pathology, Veneto Region, Venice, Italy; University of Padua Research Grant TRANSAC, Padua, Italy; Cariparo Foundation, Padua, Italy.

Conflict of interest: none declared.

References

1. Laennec RTH. *De l'auscultation médiate ou traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur*. Paris: Brosson & Chaudé, 1819.
2. Morgagni GB. *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis libri quinque*. Venetiis: ex typographia Remondiniana, 1761.
3. Marcus FI, Nava A, Thiene G. *Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/dysplasia – Recent Advances*. Milano: Springer 2007.
4. Lancisi GM. *De motu cordis et aneurysmatibus*. Caput V. Naples: excudebat Felix-Carolus Musca, 1736.
5. Elliot G. *Middlemarch*, 1st edition. Edinburgh, London: William Blackwood and Sons, 1871.
6. Osler W. *The Principles and Practice of Medicine*, 6th Edn. New York: D. Appleton & Co, 1905.
7. Segall HN. Parchment heart (Osler). *Am Heart J* 1950;**40**:948–950.
8. Uhl HSM. A previously undescribed congenital malformation of the heart: almost total absence of the myocardium of the right ventricle. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1952;**91**:197–209.
9. Basso C, Corrado D, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: what's in a name? From a congenital defect (dysplasia) to a genetically determined cardiomyopathy (dystrophy). *Am J Cardiol* 2010;**106**:275–277.
10. Dalla Volta S, Battaglia G, Zerbini E. Auricularization of right ventricular pressure curve. *Am Heart J* 1961;**61**:25–33.
11. Dalla Volta S, Fameli O, Maschio G. Le sindrome clinique et hemodynamique de l'auricularisation du ventricule droit. *Arch Mal Cœur* 1965;**58** :1129–1143.
12. Fontaine G, Frank R, Vedel J, Grosgogeat Y, Cabrol C, Facquet J. Stimulation studies and epicardial mapping in ventricular tachycardia: study of mechanisms and selection for surgery. In: Kulbertus HE (ed). *Reentrant Arrhythmias*. Lancaster, PA: MTP Publishing, 1977, p334–350.

Downloaded from by guest on July 3, 2015

13. Fontaine G, Frank R, Gallais-Hamonno F, Allali I, Phan-Thuc H, Grosgogeat Y. Electrocardiography of delayed potentials in post-excitation syndrome. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1978;**71**:854–864.
14. Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G, Martini B, Stritoni P, Fasoli G. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: a study involving nine families. *J Am Coll Cardiol* 1988;**12**:1222–1228.
15. Nava A, Bauce B, Basso C, Muriago M, Rampazzo A, Villanova C, Daliento L, Buja G, Corrado D, Danieli GA, Thiene G. Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000;**36**:2226–2233.
16. Marcus FI, Fontaine G, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue S, Grosgogeat Y. Right ventricular dysplasia. A report of 24 adult cases. *Circulation* 1982;**65**:384–398.
17. Richardson P, McKenna WJ, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen O, Thiene G, Goodwin J, Gyarfas I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 WHO/ISFC Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; **93**:841–842.
18. Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* 1988;**318**:129–133.
19. Maron BJ. Right ventricular cardiomyopathy. Another cause of sudden death in the young. *N Engl J Med* 1988;**318**:178–179 (Editorial).
20. Basso C, Thiene G, Valente M, Angelini A, Corrado D, Nava A. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: dysplasia, dystrophy or myocarditis? *Circulation* 1996; **94**:983–991.
21. Basso C, Nava A, Thiene G. *Cardiomiopatia Aritmogena*. Milano: Ed. Arti Grafiche Color Black, 2001.
22. Valente M, Calabrese F, Angelini A, Basso C, Thiene G. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998;**152**:479–484.
23. Thiene G, Corrado D, Nava A, Rossi L, Poletti A, Boffa GM, Daliento L, Pennelli N. Right ventricular cardiomyopathy: is there evidence of an inflammatory aetiology? *Eur Heart J* 1991;**12**:22–25.
24. Fontaliran F, Fontaine G, Brestescher C, Labrousse J, Vilde F. Significance of lymphoplasmocytic infiltration in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. Apropos of 3 own cases and review of the literature. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1995;**88**:1021–1028.
25. Calabrese F, Basso C, Carturan E, Valente M, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: is there a role for viruses? *Cardiovasc Pathol* 2006; **15**:11–17.
26. Thiene G, Marcus F. Arrhythmogenic cardiomyopathy: a biventricular disease in search of a cure. *Heart Rhythm* 2013;**10**:290–291.
27. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011;**474**:179–183.
28. Lombardi R, Dong J, Rodriguez G, Bell A, Leung TK, Schwartz RJ, Willerson JT, Brugada R, Marian AJ. Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Res.* 2009;**104**:1076–1084.
29. Basso C, Bauce B, Corrado D, Thiene G. Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2011;**9**:223–233.
30. Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Scampardonis G. Familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia associated with palmoplantar keratosis. *N Engl J Med* 1988; **319**:174–176.
31. Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Patsourakos P, Alexopoulous D, Gezerlis P, Simitsis S, Scampardonis G. Cardiac abnormalities in familial palmoplantar keratosis. *Br Heart J* 1986;**56**:321–326.
32. Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, Behrend M, Grund C, Thalhammer C, Vogel F, Birchmeier C, Günthert U, Franke WW, Birchmeier W. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol* 1996;**135**:215–225.
33. Coonar AS, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Needham EW, Houlston RS, Cliff S, Otter MI, Murday VA, Mattu RK, McKenna WJ. Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation* 1998;**97**:2049–2058.
34. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffrey S, McKenna WJ. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and wolly hair (Naxos disease). *Lancet* 2000;**355**:2119–2124.
35. Carvajal-Huerta L. Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy. *J Am Acad Dermatol* 1998;**39**:418–421.
36. Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, Whittock N, Leigh IM, Stevens HP, Kelsell DP. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2761–2766.
37. Kaplan SR, Gard JJ, Carvajal-Huerta L, Ruiz-Cabezas JC, Thiene G, Saffitz JE. Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome. *Cardiovasc Pathol* 2004;**13**:26–32.
38. Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:1200–1206.
39. Bauce B, Basso C, Rampazzo A, Beffagna G, Daliento L, Frigo G, Malacrida S, Settimo L, Danieli G, Thiene G, Nava A. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations. *Eur Heart J* 2005;**26**:1666–1675.
40. Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 2004;**36**:1162–1164.
41. Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2006;**113**:1171–1179.
42. Syrris P, Ward D, Evans A, Asimaki A, Gandjbakhch E, Sen-Chowdhry S, McKenna WJ. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet*, 2006;**79**:978–984.
43. Beffagna G, De Bortoli M, Nava A, Salamon M, Lorenzon A, Zaccolo M, Mancuso L, Sigalotti L, Bauce B, Occhi G, Basso C, Lanfranchi G, Towbin JA, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Missense mutations in desmocollin-2 N-terminus, associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, affect intracellular localization of desmocollin-2 in vitro. *BMC Med Genet* 2007;**8**:65.
44. Thiene G, Corrado D, Basso C. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J* 2004;**25**:1772–1775.
45. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet.* 2009;**373**:1289–1300.
46. Basso C, Czarnowska E, Della Barbera M, Bauce B, Beffagna G, Wlodarska EK, Pilichou K, Ramondo A, Lorenzon A, Wozniek O, Corrado D, Daliento L, Danieli GA, Valente M, Nava A, Thiene G, Rampazzo A. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J* 2006;**27**:1847–1854.
47. Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmbhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet.* 2001;**10**:189–194.
48. Beffagna G, Occhi G, Nava A, Vitiello L, Ditadi A, Basso C, Bauce B, Carraro G, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA, Rampazzo A. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res* 2005;**65**:366–373.
49. Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, Kupprion C, Ramadanova K, Thierfelder L, McKenna W, Gallagher B, Morris-Larkin L, Bassett AS, Parfrey PS, Young TL. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet* 2008;**82**:1–13.
50. van Hengel J, Calore M, Bauce B, Dazzo E, Mazzotti E, De Bortoli M, Lorenzon A, Li Mura IE, Beffagna G, Rigato I, Vleeschouwers M, Tyberghein K, Hulpiau P, van Hamme E, Zaglia T, Corrado D, Basso C, Thiene G, Daliento L, Nava A, van Roy F, Rampazzo A. Mutations in the area composita protein αT-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013;**34**: 201–210.
51. Taylor M, Graw S, Sinagra G, Barnes C, Slavov D, Brun F, Pinamonti B, Salcedo EE, Sauer W, Pyxaras S, Anderson B, Simon B, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H, Mestroni L. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation* 2011;**124**:876–885.
52. van Tintelen JP, Van Gelder IC, Asimaki A, Suurmeijer AJ, Wiesfeld AC, Jongbloed JD, van den Wijngaard A, Kuks JB, van Spaendonck-Zwarts KY, Notermans N, Boven L, van den Heuvel F, Veenstra-Knol HE, Saffitz JE, Hofstra RM, van den Berg MP. Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1574–1583.
53. van der Zwaag PA, van Rijsingen IA, Asimaki A, Jongbloed JD, van Veldhuisen DJ, Wiesfeld AC, Cox MG, van Lochem LT, de Boer RA, Hofstra RM, Christiaans I, van Spaendonck-Zwarts KY, Lekanne dit Deprez RH, Judge DP, Calkins H, Suurmeijer AJ, Hauer RN, Saffitz JE, Wilde AA, van den Berg MP, van Tintelen JP. Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2012;**14**:1199–1207.
54. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie

Downloaded from by guest on July 3, 2015

catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;**103**: 196–200.
55. Pilichou K, Remme CA, Basso C, Campian ME, Rizzo S, Barnett P, Scicluna BP, Bauce B, van den Hoff MJ, de Bakker JM, Tan HL, Valente M, Nava A, Wilde AA, Moorman AF, Thiene G, Bezzina CR. Myocyte necrosis underlies progressive myocardial dystrophy in mouse dsg2-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Exp Med* 2009;**206**:1787–1802.
56. Rizzo S, Lodder EM, Verkerk AO, Wolswinkel R, Beekman L, Pilichou K, Basso C, Remme CA, Thiene G, Bezzina CR. Intercalated disc abnormalities reduced Na+ current density and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathy changes. *Cardiovasc Res* 2012;**95**:409–418.
57. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G, Camerini F. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994;**71**:215–218.
58. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, Calkins H, Corrado D, Cox MG, Daubert JP, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard MH, Protonotarios N, Saffitz JE, Sanborn DM, Steinberg JS, Tandri H, Thiene G, Towbin JA, Tsatsopoulou A, Wichter T, Zareba W. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Eur Heart J* 2010;**31**:806–814.
59. Perazzolo Marra M, Leoni L, Bauce B, Corbetti F, Zorzi A, Migliore F, Silvano M, Rigato I, Tona F, Tarantini G, Cacciavillani L, Basso C, Buja G, Thiene G, Iliceto S, Corrado D. Imaging study of ventricular scar in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: comparison of 3D standard electroanatomical voltage mapping and contrast-enhanced cardiac magnetic resonance. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012; **5**:91–100.
60. Corrado D, Basso C, Leoni L, Tokajuk B, Bauce B, Frigo G, Tarantini G, Napodano M, Turrini P, Ramondo A, Daliento L, Nava A, Buja G, Iliceto S, Thiene G. Three-dimensional electroanatomic voltage mapping increases accuracy of diagnosing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circulation* 2005;**111**: 3042–3050.
61. Corrado D, Basso C, Leoni L, Tokajuk B, Turrini P, Bauce B, Migliore F, Pavei A, Tarantini G, Napodano M, Ramondo A, Buja G, Iliceto S, Thiene G. Three-dimensional electroanatomical voltage mapping and histologic evaluation of myocardial substrate in right ventricular outflow tract tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 2008;**51**:731–739.
62. Migliore F, Zorzi A, Silvano M, Bevilacqua M, Leoni L, Marra MP, Elmaghawry M, Brugnaro L, Dal Lin C, Bauce B, Rigato I, Tarantini G, Basso C, Buja G, Thiene G, Iliceto S, Corrado D. Prognostic value of endocardial voltage mapping in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;**6**:167–176.
63. Ladyjanskaia GA, Basso C, Hobbelink MG, Kirkels JH, Lahpor JR, Cramer MJ, Thiene G, Hauer RN, V Oosterhout MF. Sarcoid myocarditis with ventricular tachycardia mimicking ARVD/C. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;**21**:94–98.
64. Basso C, Ronco F, Marcus F, Abudureheman A, Rizzo S, Frigo AC, Bauce B, Maddalena F, Nava A, Corrado D, Grigoletto F, Thiene G. Quantitative assessment of endomyocardial biopsy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an in vitro validation of diagnostic criteria. *Eur Heart J* 2008;**29**:2760–2771.
65. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol* 1992;**20**:1391–1396.
66. Cerrone M, Delmar M. Desmosomes and the sodium channel complex: implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome. *Trends Cardiovasc Med* 2014;**24**:184–190.
67. Migliore F, Zorzi A, Michieli P, Perazzolo Marra M, Siciliano M, Rigato I, Bauce B, Basso C, Toazza D, Schiavon M, Iliceto S, Thiene G, Corrado D. Prevalence of cardiomyopathy in Italian asymptomatic children with electrocardiographic T-wave inversion at preparticipation screening. *Circulation* 2012;**125**:529–538.
68. Corrado D, Basso C, Pavei A, Michieli P, Schiavon M, Thiene G. Trends in sudden cardiovascular death in young competitive athletes after implementation of a preparticipation screening program. *JAMA* 2006;**296**:1593–1601.
69. Migliore F, Zorzi A, Silvano M, Basso C, Thiene G, Corrado D. Clinical management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update. *Curr Pharm Des* 2010;**16**:2918–2928.
70. Corrado D, Basso C, Pilichou K, Thiene G. Molecular biology and clinical management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Heart* 2011; **97**:530–539.
71. Basso C, Corrado D, Bauce B, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;**5**:1233–1246.
72. Rigato I, Bauce B, Rampazzo A, Zorzi A, Pilichou K, Mazzotti E, Migliore F, Perazzolo Marra M, Lorenzon A, De Bortoli M, Calore M, Nava A, Daliento L, Gregori D, Iliceto S, Thiene G, Basso C, Corrado D. Compound and digenic heterozygosity predicts life-time arrhythmic outcome and sudden cardiac death in desmosomal gene-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;**6**:533–542.
73. Corrado D, Leoni L, Link MS, Della Bella P, Gaita F, Curnis A, Salerno JU, Igidbashian D, Raviele A, Disertori M, Zanotto G, Verlato R, Vergara G, Delise P, Turrini P, Basso C, Naccarella F, Maddalena F, Estes NA 3rd, Buja G, Thiene G. Implantable cardioverter defibrillator therapy for prevention of sudden death in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circulation* 2003;**108**:3084–3091.
74. Corrado D, Calkins H, Link MS, Leoni L, Favale S, Bevilacqua M, Basso C, Ward D, Boriani G, Ricci R, Piccini JP, Dalal D, Santini M, Buja G, Iliceto S, Estes M III, Wichter T, McKenna WJ, Thiene G, Marcus FI. Prophylactic implantable defibrillator in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia and no prior ventricular fibrillation or sustained ventricular tachycardia. *Circulation* 2010; **122**:1144–1152.
75. Thiene G, Rigato I, Pilichou K, Corrado D, Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. What is needed for a cure? *Herz* 2012;**37**:657–662.
76. Corrado D, Basso C, Rizzoli G, Schiavon M, Thiene G. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**: 1959–1963.
77. Philips B, Madhavan S, James C, Tichnell C, Murray B, Dalal D, Bhonsale A, Nazarian S, Judge DP, Russell SD, Abraham T, Calkins H, Tandri H. Outcomes of catheter ablation of ventricular tachycardia in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;**5**:499–505.
78. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**:663–676.
79. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering C, Kan NG, Forcales S, Puri PL, Leone TC, Marine JE, Calkins H, Kelly DP, Judge DP. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 2013;**494**:105–110.
80. Murry CE, Pu WT. Reprogramming fibroblasts into cardiomyocytes. *New Engl J Med* 2011;**364**:177–178.
81. Asimaki A, Kapoor S, Plovie E, Karin Arndt A, Adams E, Liu Z, James CA, Judge DP, Calkins H, Churko J, Wu JC, MacRae CA, Kléber AG, Saffitz JE. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2014;**6**:240ra74.
82. Denegri S, Bongianino R, Lodola F, Boncompagni S, De Giusti VC, Avelino-Cruz JE, Liu N, Persampieri S, Curcio A, Esposito F, Pietrangelo L, Marty I, Villani L, Moyaho A, Baiardi P, Auricchio A, Protasi F, Napolitano C, Priori SG. Single delivery of an adeno-associated viral construct to transfer the CASQ2 gene to knock-in mice affected by catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is able to cure the disease from birth to advanced age. *Circulation* 2014;**129**:2673–2681.
83. Bushby K, Lochmuller H, Lynn S, Straub V. Interventions for muscular dystrophy: molecular medicines entering the clinic. *Lancet* 2009;**374**:1849–1856.

Downloaded from by guest on July 3, 2015

XENOPUS LAEVIS, ANFIBIO ANURO, MODELLO ANIMALE DI RIGENERAZIONE DEGLI ARTI AMPUTATI, COLMA IL GAP CONOSCITIVO TRA GLI ANFIBI URODELI RIGENERANTI E I VERTEBRATI SUPERIORI NON RIGENERANTI

DOMENICO BARONE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

Xenopus laevis

Xenopus laevis (*Bufo laevis*, Daudin, 1802) (fig. 1) è un anfibio anuro (privo di coda), rana acquatica della famiglia *Pipidae*. I maschi, lunghi 5–6 cm, pesano ~60 g, le femmine raggiungono i 10–12 cm e i 200 g. Hanno pelle liscia (*laevis*), variegata dal grigio al verde oliva sul dorso, ventre biancastro con sfumature giallastre, corpo appiattito e testa a forma triangolare. Sono privi di lingua, di dentatura, e di orecchie esterne. Nei maschi manca il sacco vocale. Gli occhi, piccoli e situati nella parte anteriore del capo, sono privi di palpebre. Gli arti anteriori sono piccoli e non palmati, le zampe posteriori, grandi e palmate, hanno piccoli artigli sulle falangi distali delle prime tre dita,.

Gli *Xenopus* trascorrono la maggior parte del ciclo vitale in acqua. La loro dieta si basa, quasi esclusivamente, sulla predazione di organismi acquatici, in prevalenza crostacei, su piccoli animali terrestri caduti in acqua, e uova e larve di altre specie di anfibi.

Dopo l'accoppiamento la femmina depone centinaia di uova, attaccandole, singolarmente o in piccoli gruppi, a piante acquatiche, rocce o altre strutture bentoniche. Dalle uova si sviluppano i girini (fig. 2) che completano il loro sviluppo (metamorfosi) in 6-8 settimane.

Tra i primi vertebrati a essere clonato (1958), da oltre mezzo secolo *Xenopus laevis* è un importante organismo modello in biologia evolutiva dello sviluppo; i suoi oociti sono spesso usati in biologia molecolare per studiare l'espressione del DNA o del mRNA, in un sistema controllato.

Scopo di questa breve rassegna è ripercorrere, a grandi linee, l'evoluzione del modello di rigenerazione dell'arto amputato in *Xenopus laevis*, attraverso alcune delle tappe di un processo di affinamento che, recentemente, ha prodotto risultati interessanti per le possibili ricadute sul progresso della medicina rigenerativa.

Fig. 1. *Xenopus laevis*, anfibio anuro (da: it.Wikipedia.org)

Effetto dell'esposizione ad una corrente elettrica sulla rigenerazione dell'arto amputato di *Xenopus laevis*

Monconi degli arti anteriori amputati di *Xenopus laevis* sono stati esposti, per 3-4 settimane, a una corrente continua di bassa intensità (0,1 μA). Dopo 6-12 mesi, alcuni rigenerati stimolati elettricamente hanno formato strutture robuste, appiattite e biforcate, mentre i controlli, sottoposti a trattamento si-

mulato, hanno generato solo tipici spuntoni ipomòrfici. Nella maggior parte dei rigenerati stimolati elettricamente, si potevano osservare tronchi nervosi all'interno del loro core cartilagineo, mentre, a eccezione di un caso, non era presente traccia di tessuto nervoso nelle cartilagini dei controlli: complessivamente, il *core* cartilagineo dei rigenerati stimolati era interessato da un passaggio di nervi 40 volte maggiore rispetto i controlli *shame exposed*. Infine, papille epidermiche mature a forma di spina si sono formate nella maggior parte degli animali stimolati, ma solo in un animale di controllo.

Fig. 2. Girini di *Xenopus laentis* in diversi stadi di sviluppo (da pmg-gemstone)

In conclusione. correnti elettriche di bassa intensità influiscono sulla rigenerazione dell'arto amputato, stimolando anzitutto la crescita precoce dei nervi (Borgens, 1979).

Rigenerazione intercalare negli Anfibi e regola della trasformazione distale

Il concetto di "rigenerazione intercalare" è stato formulato a seguito di una serie di esperimenti di trapianto negli Urodeli, nei quali si è dimostrato che, quando un frammento distale dell'arto veniva impiantato sul rimanente moncone prossimale, le parti mancanti venivano ricostituite in dimensioni e proporzioni normali. Tuttavia, quando il frammento distale veniva innestato a un livello più distale, la parte originale della zampa non veniva ricostruita; una struttura intercalare, con polarità opposta, veniva invece, rigenerata, risultando in un arto più lungo.

L'applicabilità, all'arto degli Anfibi, della regola della "trasformazione distale", per la quale "*un tessuto, da qualunque livello, può solo diventare più distale, ovvero solo le strutture distali all'amputazione sono rigenerate*", è stata sottoposta a test durante la rigenerazione intercalare, spostando l'innesto del trapianto a vari livelli. Dopo l'innesto di blastemi[1] distali su un moncone prossimale, in modo che parte del *pattern* presunto andasse persa, si sono, tuttavia, formate zampe complete.

È stato dimostrato che il tessuto intercalato è originato completamente dal moncone amputato, scambiando blastemi tra animali chiari e animali scuri. Quando il blastema distale è stato innestato su un moncone prossimale irradiato, eliminando il contributo di quest'ultimo, si sono prodotte delezioni intercalari che non erano dovute all'impossibilità del tessuto irradiato e di quello normale di comunicare tra loro, poiché blastemi distali irradiati si sono innestati sui monconi prossimali, stimolando la rigenerazione intercalare. Infine, quando blastemi prossimali sono stati innestati a livelli distali, si sono ottenuti rigenerati intercalari nel 20% circa dei casi e, in queste circostanze, il blastema innestato è stato l'unica sorgente di tessuto intercalare. Non è stato possibile determinare l'esatta struttura di questi elementi intercalati, ma si è pensato che fossero di polarità invertita, come dimostrato negli insetti (Madem, 1980) e negli Urodeli.

Fig. 3. *Triturus cristatus* (tritone), anfibio Urodelo (foto R. Griffiths)

fgf-10 mesenchimale è responsabile della capacità rigenerativa di *Xenopus laevis*

Vent'anni dopo, i risultati di due ricerche sul ruolo di *fgf-10*[2] nelle capacità rigenerative di *Xenopus laevis* amputato hanno contribuito a ridurre il *gap* conoscitivo tra le capacità rigenerative degli Urodeli e l'assenza di rigenerazione nei vertebrati superiori. Giovani larve (girini[3], fig. 2) di anfibi Anuri riescono a rigenerare completamente una arto amputato, ma tale capacità va incontro a declino ontogenetico. Tuttavia, non era chiaro a quel tempo se responsabile di tale declino fosse il tessuto mesenchimale[4] o quello epidermico. Inoltre, poco si sapeva sulle interazioni molecolari tra questi due tessuti durante il processo rigenerativo.

I risultati di questo studio hanno dimostrato che l'espressione di *fgf-10* nelle cellule mesenchimali dell'arto corrisponde, senza dubbio, alla capacità rigenerativa e che *fgf-10* e *fgf-8* sono riespressi sinergisticamente nei blastemi rigeneranti. Tuttavia, né *fgf-10* né *fgf-8* sono espressi dopo amputazione di un arto non rigenerante. Ciononostante, tessuto epidermico non rigenerante esprime *fgf-8* sotto l'influsso di un mesenchima rigenerante, come dimostrato da esperimenti che usavano un arto ricombinante composto da mesenchima di una arto rigenerante e da epidermide di un arto non rigenerante.

Questi dati, ottenuti con esperimenti di trapianto reciproco tra arti rigeneranti e arti non rigeneranti di *Xenopus laevis*, dimostrano che le capacità rigenerative di un arto di *Xenopus* dipendono dal tessuto mesenchimale e suggeriscono che *fgf-10* sia, verosimilmente, coinvolto in questa capacità. Tuttavia, i risultati di questo studio non fornivano un'evidenza conclusiva che FGF-10 fosse responsabile della capacità rigenerativa dell'arto di questo anuro (Yokoyama, 2000).

Per chiarire questo punto, nella seconda ricerca è stato investigato il ruolo di *fgf-10* sulla capacità rigenerativa, introducendo la proteina per la quale codifica, FGF-10, nei monconi di arti amputati e non rigeneranti di *Xenopus*: FGF-10, somministrato per via esogena, ha stimolato con successo la capacità rigenerativa, con conseguente re-induzione dell'espressione di tutti i geni esaminati (inclusi *shh*, *msx-1* e *fgf-10*) e rigenerazione delle strutture ben formate dell'arto.

Quindi, una ben precisa molecola attiva la capacità rigenerativa dell'arto amputato di *Xenopus* e questi risultati suggeriscono che FGF-10 possa essere la molecola chiave nel rendere possibile la rigenerazione di zampe non rigeneranti nei vertebrati superiori (Yokoyama, 2001).

Rigenerazione di arti in girini di *Xenopus laevis*

La rigenerazione delle zampe in girini di anfibi rappresenta un classico processo di epimòrfosi[5]. Questo tipo di rigenerazione, nel quale una massa di cellule indifferenziate, chiamata "blastema", prolifera per reintegrare la/e parte/i persa/e di un organo amputato, è un processo diverso dalla morfallàssi[6] osservata, ad esempio, in *Hydra*, in cui il riarrangiamento di cellule e tessuti pre-esistenti contribuisce, per larga parte, al processo rigenerativo.

A differenza della rigenerazione completa dell'arto amputato che si osserva durante tutto il ciclo vitale degli anfibi Urodeli, in *Xenopus*, anfibio anuro, un decennio fa la rigenerazione completa era ancora considerata appannaggio della sola vita larvale (girino). Perciò, essendo questo lo stato dell'arte a quel tempo, c'è stato chi ha suggerito di considerare la rigenerazione dell'arto amputato negli *Xenopus* adulti, mancanti di *pattern*/tessuto, un esempio di epimòrfosi (Suzuki, 2006).

Riegenerazione dell'arto amputato e sviluppo dell'arto a confronto

La rigenerazione degli arti in Salamandre e Tritoni (fig. 3) (anfibi Urodeli) è un classico esempio di morfogènesi[7] e di modellamemto (*patterning*) dei tessuti rigeneranti.

Grazie ai progressi nella marcatura delle cellule e nell'analisi molecolare, ha iniziato a delinearsi una comprensione meccanicistica più precisa di questo processo. Due domande, in particolare, erano da tempo senza risposte: 1) la rigenerazione dell'arto amputato è un nuovo processo di sviluppo? Ovvero, fino a che punto, e in quale misura, la rigenerazione della arto amputato ricapitola la cascata degli eventi osservati nello sviluppo dell'arto nei mammiferi? Inoltre, 2) in quale misura gli aspetti mostrati sono specifici dell'adulto o del modello animale (la salamandra/il tritone).

Gli studiosi dello sviluppo e della rigenerazione dell'arto amputato da sempre propongono differenti modelli di formazione del *patterning*, cioè dei punti base di riferimento necessari perché si formi una struttura nella quale tessuti e organi si sviluppino nella sede e con l'orientamento corretti. Questo processo è controllato dall'interazione di numerosi morfògeni, codificati da geni materni ed embrionali, l'espressione dei quali è intrinsecamente coordinata. Dati recenti sullo sviluppo ontogenetico dell'arto e sul processo di rigenerazione dopo amputazione, portano alla conclusione che, sebbene i meccanismi di *patterning* siano probabilmente simili, la plasticità cellulare e le *pathway* dei segnali tra i nervi giochino ruoli specifici nel processo rigenerativo (Naku. 2010).

Ruolo della *Hippo signaling pathway* nella rigenerazione in *Xenopus*

Il *pathway* di segnalazione *Hippo*[8], altamente conservato dagli insetti ai mammiferi, è importante per molti processi, proliferazione cellulare, apoptosi e omeostasi dei tessuti incluse, ma è cruciale anche per i processi rigenerativi, compresa la rigenerazione intercalare del corpo intero nei Platelminti e dell'arto degli ortotteri (*Gryllidae*). Tuttavia, il suo ruolo nella rigenerazione epimòrfica dei vertebrati rimane sconosciuto.

Per identificare i principi della rigenerazione che sono conservati nei *Bilateria* (animali con simmetria bilaterale), recentemente è stato investigato il ruolo della segnalazione *Hippo*

nella rigenerazione di un abbozzo di arto di *Xenopus laevis*. Il fattore di trascrizione Yap1, importante effettore *downstream* della segnalazione *Hippo*, è sovra-regolato nell'abbozzo dell'arto rigenerante. Per valutare il ruolo di Yap1 nella rigenerazione, sono stati costruiti animali transgenici esprimenti una forma dominante negativa di Yap1, sotto un promotore *heat-shock*. La sovra-espressione di una forma dominante negativa di Yap1 nei girini ha ridotto la proliferazione cellulare, ha indotto apoptosi ectopica, ha perturbato i domini di espressione dei geni *patterning* l'arto, inclusi *hoxa13*, *hoxa11* e *shh*, nell'abbozzo dell'arto rigenerante. L'espressione transiente di uno Yap dominante negativo in girini transgenici ha causato anche difetti nella rigenerazione dell'abbozzo dell'arto e ridotto la rigenerazione intercalare.

Nell'insieme, questi risultati indicano che Yap1 svolge un ruolo cruciale nel controllo della capacità rigenerativa dell'arto amputato di *Xenopus* e che il coinvolgimento della segnalazione *Hippo* nella rigenerazione è conservata tra vertebrati e invertebrati. Queste risultati forniscono evidenze molecolari che principi comuni sono alla base della rigenerazione attraverso i *phyla* e possono contribuire allo sviluppo di terapie innovative nella medicina rigenerativa (Hayashi, 2014).

Modifiche epigenetiche mantengono una memoria cellulare ereditabile dell'identità intrinseca delle cellule dell'arto amputato di *Xenopus*

Molti anfibi possono rigenerare gli arti, anche in età adulta. Se un arto è amputato, il moncone genera un blastema che dà luogo a un nuovo arto completo, in un processo simile alla morfogenesi dello sviluppo. Si pensa che il blastema erediti le sue proprietà di *patterning* dell'arto dalle cellule del moncone dell'arto stesso e che mantenga le informazioni, nonostante cambiamenti nella morfologia, nell'espressione genica e negli stati di differenziamento necessari per la rigenerazione dell'arto. E' stato ipotizzato che queste proprietà cellulari siano mantenute come memoria epigenetica[9] attraverso modifiche degli istoni.

Per verificare questa ipotesi, sono state analizzate le modifiche degli istoni[10] in tutto il genoma durante la rigenerazione dell'abbozzo dell'arto amputato di *Xemopus laevis*. La trimetilazione dell'istone H3 alla lisina 4 (H3K4me3) è strettamente correlata a una struttura aperta della cromatina, che permette l'accesso dei fattori di trascrizione ai geni, mentre la trimetilazione dell'istone H3 alla lisina 27 (H3K27me3) è da mettere in relazione a uno stato chiuso della cromatina, che blocca l'accesso dei fattori di trascrizione. Questi due profili di modifiche sono stati confrontati con *high-throughput sequencing* di campioni dell'abbozzo dell'arto intatto e del blastema rigenerante, per mezzo di immunoprecipitazione della cromatina. Per molti geni dello sviluppo, le modifiche degli istoni al sito iniziale della trascrizione erano le stesse nel moncone dell'arto e nel blastema rigenerante, sono rimaste stabili durante la rigenerazione e corrispondevano bene alle proprietà dell'arto.

Questi risultati supportano l'ipotesi di partenza, che le modifiche degli istoni funzionino da memoria cellulare ereditabile per mantenere le proprietà delle cellule dell'arto, nonostante cambiamenti dinamici nell'espressione genica durante la rigenerazione dell'abbozzo dell'arto rigenerante in *Xenopus laevis* (Hayashi, 2015).

***Xenopus laevis*, modello animale di rigenerazione degli arti amputati, a ponte tra gli anfibi Urodeli e i vertebrati superiori**

Le capacità rigenerative di un arto amputato variano molto tra i vertebrati. Ad esempio, i mammiferi non possono rigenerare una struttura dopo amputazione prossimale all'articolazione delle dita e sono incapaci di rigenerare articolazioni. Al contrario, molti anfibi Urodeli (tritoni e salamandre) sono in grado di rigenerare, durante tutto il ciclo vitale, la struttura

completa degli arti amputati. Negli anfibi Anuri (rane e rospi), invece, la rigenerazione completa dell'arto amputato era descritta, fino a pochi mesi fa, solo durante lo stadio larvale: si pensava che, dopo la metamorfosi, questa capacità si perdesse. Gli *Xenopus* adulti, per esempio, dopo amputazione effettuata a qualunque livello lungo l'asse dell'arto, rigenerano una singola asta cartilaginea ipomòrfica, spuntone (*spike*) privo di articolazioni, muscoli, ossa mineralizzate, tendini e legamenti. Perciò, la rigenerazione dell'arto nelle rane adulte era considerata modello intermedio tra la rigenerazione dell'arto negli anfibi urodeli e la situazione dei vertebrati superiori, mammiferi compresi.

Sia negli Urodeli che negli Anuri, dopo l'amputazione dell'arto, l'epitelio ferito ricopre subito la superficie del moncone amputato, mentre le cellule nel tessuto del moncherino perdono l'aspetto di cellule differenziate e iniziano a proliferare sotto l'epitelio ferito, dando luogo a un blastema. Una volta formato, il blastema, epimorficamente e autonomamente, ri-sviluppa la struttura distale. C'è, inoltre, un processo, chiamato "meccanismo di re-integrazione", grazie al quale i tessuti rigenerati epimorficamente e quelli nativi originali sono re-integrati. Negli Urodeli il blastema ri-esprime geni essenziali per lo sviluppo dell'arto, mentre il blastema degli Anuri non ne mostra l'espressione: probabilmente, questa è la ragione per la quale questi ultimi non riescono a ricapitolare il programma di sviluppo dell'arto come gli Urodeli. Sono molti i tentativi fatti per accrescere e indirizzare opportunamente il potenziale rigenerativo dell'arto amputato delle rane, ricorrendo alle conoscenze sul processo della rigenerazione degli arti degli Urodeli. La capacità delle articolazioni funzionali di rigenerarsi può essere considerata uno passo chiave importante per gettare un ponte tra le specie che rigenerano e quelle che non rigenerano.

Per rendere un'articolazione funzionale come componente dell'apparato locomotore, è indispensabile che le inserzioni muscolari avvengano correttamente, tramite tendini, nei tessuti scheletrici che partecipano all'articolazione. Nello sviluppo naturale dell'arto, i tenociti, cellule progenitrici dei tendini, si sdifferenziano dalle cellule del mesenchima, originato dalla piastra laterale del mesoderma, alla periferria dell'embrione. Nel tendine maturo, i tenociti si depositano e vengono incorporati in un'abbondante matrice extracellulare contenente collagene e piccoli proteoglicani ricchi di leucina.

Basandosi sulla strategia di ricapitolare il meccanismo dello sviluppo naturale delle articolazioni all'interno del blastema, sono stati tentati vari approcci per rigenerare l'articolazione amputata nelle rane. La somministrazione di Bmp4 (*bone morphogenetic protein,* membro di una famiglia parte della super-famiglia *transforming growth factor-β*) durante la rigenerazione può causare interruzioni articolazione-simili nello spuntone cartilagineo rigenerato, ma queste strutture simili ad articolazioni, indotte negli spuntoni con un trattamento artificiale, non hanno alcuna delle caratteristiche di un'articolazione funzionale.

D'altra parte, dopo amputazione dell'arto a livello dell'articolazione nel tritone *Cynops pyrrhogaster*, l'interazione tra i tessuti residui e quelli rigenerati ha un effetto significativo sulla morfogènesi del gomito rigenerato e può portare a una re-integrazione strutturale tra i tessuti risparmiati dall'amputazione e quelli rigenerati, nell'articolazione di un gomito funzionale. Con la tecnica dell'*episcopic fluorescence image capture* (EFIC) è stata osservata l'esatta morfologia 3D dei tessuti, ossa, cartilagine, tendini e muscoli inclusi (Tsutsumi, 2015). Partendo da questi risultati nel tritone, è stato seguito un approccio alternativo nel tentativo di ottenere la rigenerazione dell'articolazione anche nelle rane.

L'ipotesi alla base di questa ricerca era che, se l'arto di una rana è amputato all'altezza dell'articolazione del gomito, questa possa essere rigenerata grazie all'interazione tra i tessuti risparmiati dall'amputazione e i tessuti rigenerati. Coerentemente con questa ipotesi, si è trovato che, dopo l'amputazione dell'arto al gomito, le rane (*Xenopus* in questo caso) possono rigenerare un gomito funzionale al capo prossimale dello spuntone cartilagineo riformato.

L'osservazione con la EFIC ha mostrato chiaramente che non solo l'osso non interessato dall'amputazione (omero) e lo spuntone cartilagineo rigenerato, ma anche muscoli e tendini erano strutturalmente e funzionalmente integrati nell'articolazione di un gomito funzionale.

Questi risultati potrebbero aprire la possibilità per chiarire i meccanismi cellulari, molecolari e epigenetici coinvolti nella rigenerazione delle articolazioni in *Xenopus laevis* (Tsutsumi, 2016).

Vediamo dunque alcuni tra i risultati principali della ricerca fondamentale di questo gruppo giapponese sulla rigenerazione dell'arto amputato di *Xenopus*.

1) Rigenerazione funzionale dell'articolazione del gomito in *Xenopus laevis*

Nelle rane, i due elementi scheletrici dello zeugopodio[11] (radio e ulna), separati negli altri tetrapodi, sono fusi nel radio-ulna; inoltre, c'è un osso sesamoide, olecrano, oltre il capo prossimale del radio-ulna.

Per valutare l'/gli effetto/i dei tessuti risparmiati dall'amputazione sulla morfogenesi dei tessuti rigenerati, l'arto anteriore di uno *Xenopus* è stato amputato in un punto leggermente distale rispetto al gomito e i resti del radio-ulna amputati sono stati rimossi dallo stilopodio[12]. Dopo l'amputazione, 17 rane su 19 (89,5%) hanno rigenerato uno spuntone sul moncone, in un tempo paragonabile a quello delle rane amputate a livello dello stilopodio o dello zeugopodio. I movimenti degli arti rigenerati sono stati esaminati per appurare se un gomito funzionale era stato ricostituito tra l'omero e lo spuntone rigenerato: nonostante che la parte distale del gomito originale fosse stata eliminata completamente per via chirurgica, gli esemplari di *Xenopus* compivano movimenti di flessione e di estensione dell'articolazione del gomito dell'arto rigenerato. *Xenopus* è quindi in grado di rigenerare un'articolazione del gomito, biomeccanicamente funzionale, tra l'epifisi distale dell'omero (non amputato) e lo spuntone cartilagineo neoformato.

Inoltre, poiché per essere funzionale, un'articolazione necessita dell'integrazione di una molteplicità di tessuti (muscoli, tendini, ossa, nervi) la funzionalità biomeccanica del gomito rigenerato suggerisce che sia il muscolo flessore, che quello estensore dello stilopodio, si siano inseriti correttamente tramite tendini nella cartilagine rigenerata.

2) Rigenerazione della morfologia di giuntura concava dopo amputazione al gomito

La morfologia della residua regione articolare del gomito al capo omerale distale è risultata equivalente al tessuto intatto e la cartilagine rigenerata non era connessa ininterrottamente all'omero, indicando che *Xenopus* aveva rigenerato una morfologia articolare concava al capo prossimale dello spuntone cartilagineo. All'esame alla EFIC, le immagini ricostruite in 3D hanno evidenziato che la forma concava del capo prossimale dello spuntone era complementare a quella dell'opposta parte convessa dell'articolazione del gomito (capo omerale) che, a sua volta, era confrontabile con la forma del capo prossimale del radio-ulna dell'arto intatto, prima dell'amputazione. Anche la morfologia concava del capo prossimale dello spuntone era confrontabile con quella del radio-ulna intatto.

3) Inserzione dei muscoli flessore ed estensore dello stilopodio nella cartilagine dello spuntone rigenerato

Tra i muscoli e i tendini inseriti sul radio-ulna dell'arto intatto, sono stati studiati il bicipite (*m. sternoradialis*) e il tricipite (*m. triceps brachii*) con i tendini corrispondenti, che agiscono rispettivamente da potenti flessore ed estensore dell'avambraccio.

Nell'arto rigenerato dopo amputazione al gomito, il tendine distale del bicipite era inserito nell'estremità anteriore e il tendine distale del tricipite era inserito in quella posteriore dello spuntone rigenerato: ambedue risultavano inseriti come nell'arto integro.

4) Time-course del processo di rigenerazione di un'articolazione funzionale dopo amputazione al gomito

Subito dopo l'amputazione, si è verificato che il radio-ulna (zeugopodio) fosse stato completamente eliminato, mentre il lato prossimale dell'articolazione del gomito fosse intatto. A 1 settimana dall'amputazione, l'epitelio ferito ricopriva il moncone; dopo 2 settimane dall'intervento, si era formato un blastema tra l'epitelio ferito e la cartilagine articolare dell'epifisi distale dell'omero che rimaneva intatta e manteneva la sua forma. A 3 settimane, si poteva osservare cartilagine nel blastema, mentre la cartilagine articolare dell'omero e la cartilagine dello spuntone rigenerato erano a contatto. A 4 settimane, la morfologia dell'articolazione del gomito era rigenerata al capo prossimale dello spuntone, nella cui cartilagine i tendini dei muscoli stilopodiali erano correttamente inseriti.

5) Espressione di *Gdf5* e *Sox9* nella cartilagine dello spuntone rigenerato

È stata eseguita una *in situ hybridization* dei geni *Dfd5 e Sox9* in sezioni seriali durante la formazione dello spuntone, dopo amputazione al gomito. L'espressione di *Gdf5* è stata osservata per prima nel blastema, attorno alla cartilagine articolare residua, 2 settimane dopo l'amputazione. Sebbene il *pattern* di espressione di *Gdf5* facesse pensare al differenziamento di un'*interzone-like cells*[13] durante la rigenerazione dell'arto, a giudicare dall'espressione sovrapposta di *Sox9*, si è concluso che *Gdf5* era espresso nella cartilagine rigenerante. Questi *overlapping pattern* dell'espressione di *Gdf5 e Sox9* potevano essere osservati anche 3 e 4 settimane dopo l'amputazione. L'espressione di *Gdf5*, forte nell'interzona durante lo sviluppo dell'articolazione, era debole in corrispondenza delle parti di connessione tra cartilagine residua e tessuti rigeneranti. Il fatto che *Gdf5* non fosse espresso specificamente nell'articolazione rigenerante, ma espresso piuttosto nell'intera cartilagine rigenerante durante tutto il processo rigenerativo, fa pensare che i meccanismi molecolari della rigenerazione articolare potrebbero non essere in comune con quelli del naturale sviluppo articolare.

6) Attività del segnale Wnt/β-catenina nell'articolazione rigenerante

È noto che, oltre all'espressione di *Gdf5,* la via di segnalazione Wnt/β-catenina[14] contribuisce alle attività anti-condrogeniche delle cellule articolari, durante lo sviluppo dell'articolazione. Perciò, si è cercato di capire se la segnalazione Wnt/β-catenina sia coinvolta nella separazione della connessione parziale tra la cartilagine articolare rimanente e i tessuti rigeneranti, osservata a 3 settimane dall'amputazione. Usando l'anticorpo H102-anti-β-catenina, l'attività del segnale Wnt/β-catenina è rilevabile come accumulo nucleare di β-catenina. La colorazione dell'anticorpo anti-β-catenina è stata rilevata in quasi tutte le cellule, eccettuate quelle nella parte centrale della articolazione residua dopo amputazione. Così, è stato osservato accumulo nucleare di β-catenina nelle cellule della cartilagine dello spuntone rigenerato e sulle cellule superficiali della cartilagine non amputata. Ciononostante, non è stato possibile rilevare β-catenina nel nucleo delle cellule della parte di connessione tra la rimanente cartilagine articolare dell'omero e la cartilagine rigenerante dello spuntone. Quindi, come il *pattern* di espressione di *Gdf5*, anche il *pattern* di accumulo nucleare di β-catenina non supporta la

condivisione del meccanismo molecolare tra il differenziamento della cellule dell'interzona durante lo sviluppo naturale dell'articolazione e la separazione della parte di connessione durante la rigenerazione dell'articolazione.

7) Rigenerazione e inserzione dei tendini nella cartilagine dello spuntone

L'evidenza che i tendini associati ai muscoli rimanenti (dopo amputazione) si sono inseriti nello spuntone cartilagineo suggerisce con forza che tendini e giunzioni tendineo-cartilaginee si siano rigenerati nello spuntone, dopo amputazione al gomito.

l processo di rigenerazione dei tendini e delle giunzioni muscolo-tendinee è stato seguito tramite l'espressione di *Scx*, gene importante nello sviluppo dei tendini. Il segnale dell'espressione di *Scx* era rilevabile nei tendini in sviluppo e in parte della cartilagine dell'arto rigenerante. I *pattern* di espressione di *Scx* e *Sox9* nello spuntone rigenerato sono stati osservati, a 4 settimane dall'amputazione al gomito, mediante *in situ hybridization* di sezioni seriali. L'espressione di *Scx,* nella cartilagine dello spuntone rigenerato, era ampiamente sovrapposta ai tessuti rigenerati esprimenti *Sox9*. Alcune cellule esprimenti *Scx* sono state notate al di fuori della regione *Sox9* positiva: il confronto con il *pattern* di colorazione con *Elastica van Gieson*[15] ha mostrato che queste singole cellule *Scx*-positive erano localizzate tra il muscolo residuo dopo l'amputazione e lo spuntone cartilagineo rigenerato, suggerendo che le cellule progenitrici dei tendini siano state rigenerate e che connettessero l'estremità dei muscoli rimanenti e i tendini alla cartilagine dello spuntone rigenerato.

8) Coinvolgimento della composizione della matrice extracellulare (MEC) nella cartilagine articolare residua durante la rigenerazione dell'articolazione

La composizione della MEC determina varie caratteristiche della cartilagine articolare, proprietà meccaniche della cartilagine e proprietà cellulari dei condrociti incluse, regolando la localizzazione delle molecole di segnale e trasducendo segnali mediati dalle integrine attraverso l'interazione delle cellule con la MEC. Così, è possibile che i cambiamenti osservati nella composizione della MEC possano aver causato il rilascio di alcune molecole di segnale che hanno stimolato le cellule del blastema nei tessuti rigeneranti a formare un'articolazione funzionale. Inoltre, è possibile che i condrociti presenti nella restante cartilagine articolare siano andati incontro a de-differenziamento e proliferazione cellulare e che queste cellule abbiano contribuito alla cartilagine dello spuntone rigenerante attraverso all'alterazione delle proprietà cellulari accompagnata dalla perdita di componenti della MEC (Tsutsumi, 2015).

In base ai dati di biochimica e di biologia molecolare disponibili, questi risultati si possono spiegare col fatto che il processo rigenerativo dipenderebbe dall'interazione tra i tessuti non rimossi dall'amputazione e i tessuti rigeneranti. Tale interazione guiderebbe crescita e integrazione dei tessuti rigeneranti nei tessuti del moncone amputato, in un processo definito di "re-integrazione". Ulteriori studi di queste interazioni, e del processo di "re-integrazione" negli Anuri mutilati, dovrebbero chiarire del tutto i meccanismi cellulari, biochimici, molecolari e genetici responsabili della rigenerazione anatomo-funzionale delle articolazioni amputate.

9) Riformazione della struttura scheletrica a incastro

Il differenziamento delle cellule dell'interzona è un passaggio critico per la morfogenesi dell'articolazione durante lo sviluppo. In questo studio è stato osservato che la cartilagine

articolare residua e la cartilagine dello spuntone rigenerante erano parzialmente connesse in uno stadio precoce della rigenerazione, per separarsi poi completamente, in una fase successiva, a opera della cavità articolare. Inoltre la parte di connessione era debolmente colorata con Alcyan blu, denunciando la presenza di cellule dell'interzona. Sebbene la cartilagine articolare residua e quella dello *spike* rigenerante fossero parzialmente connesse, la discontinuità di questi tessuti sembrava persistere attorno al resto dell'articolazione durante tutto il processo rigenerativo. E' possibile che tale discontinuità possa essere importante per le cellule della parte di connessione per interrompere il differenziamento in condrociti e successivamente rendere completa la separazione dell'articolazione rigenerata (Tsutsumi, 2016).

Conclusioni

Questa recentissima ricerca, pubblicata nel febbraio 2016, descrive per prima la rigenerazione in *Xenopus laevis* di un'articolazione funzionale in grado di compiere movimenti di abduzione e di adduzione dell'avambraccio rispetto al braccio. Arriva dopo oltre 40 anni di ricerche sulla rigenerazione dell'arto amputato degli anfibi Anuri, in particolare di *Xenopus laevis*, e valida questa rana acquatica come modello di elezione per colmare il *gap* rigenerativo che divide gli anfibi Urodeli dai vertebrati superiori.

L'analisi alla EFIC ha mostrato, senz'ombra di dubbio, che la struttura di un gomito è stata rigenerata al capo terminale prossimale dello spuntone cartilagineo rigenerato dopo amputazione e che i capi articolari dell'omero e dello spuntone si affrontano in modo complementare. Inoltre, almeno i tendini del rimanente stilopodio (omero), che àncorano i muscoli flessore maggiore ed estensore, si sono inseriti in modo funzionale nello spuntone cartilagineo rigenerato dopo amputazione a livello del gomito.

Questi risultati permettono di asserire che l'interazione tra i tessuti non amputati e quelli rigenerati, componenti l'articolazione neoformata, ha la capacità non solo di determinare la morfologia della cartilagine rigenerata, ma anche di reintegrare molteplici tessuti, in modo da rendere possibile la funzionalità dell'articolazione rigenerata.

Note

Nota 1. In embriologia, blastema è un gruppo di cellule che rimangono a lungo indifferenziate e, proliferando, danno origine ad abbozzi di organi. Il blastema di rigenerazione origina gli organi che si rigenerano

Nota 2. Il gene *fgf-10* codifica per una proteina (FGF) membro della famiglia fibroblast growth factor. I membri di questa famiglia hanno ampie attività mitògene e di sopravvivenza cellulare, e sono coinvolte in una varietà di processi biologici tra i quali lo sviluppo embrionale, crescita cellulare, morfogenesi, riparazione dei tessuti danneggiati, crescita e invasione tumorali.

Nota 3. Il girino propriamente detto è lo stadio larvale (foto 2) degli anfibi anuri come rane e rospi, mentre per gli anfibi urodeli, come tritoni e salamandre, si parla di larva. Tuttavia, il termine girino viene comunemente usato per indicare gli stadi larvali sia di urodeli sia di anuri

Nota 4. Il mesenchima è il tessuto connettivo embrionale. Ha origine dal distacco di cellule dai foglietti embrionali, soprattutto da quello mediano (mesoderma). Un mesenchima può tuttavia derivare anche da determinate parti dell'ectoderma e dell'endoderma.

Nota 5. Il termine epimòrfosi indica un tipo di rigenerazione patologica o recuperativa, in cui alla formazione della nuova parte non partecipano tessuti pre-esistenti, ma la parte si rigenera da materiale interamente neoformato.

Nota 6. Morfallassi è un tipo di rigenerazione in cui la parte mancante viene ricostituita per riorganizzazione dei tessuti residui, dopo un processo di sdifferenziamento.

Nota 7. In biologia la morfogènesi è lo sviluppo della forma e della struttura di un organismo, sia da un punto di vista evolutivo, sia dal punto di vista dello sviluppo ontogenetico del singolo organismo, a partire dalla cellula fecondata (sviluppo embrionale); in quest'ultimo caso, il processo è favorito dall'azione dei morfògeni.

Nota 8. L'*Hippo signaling pathway*, noto anche come Salvador/Warts/Hippo (SWH) *pathway*, controlla le dimensioni degli organi attraverso la regolazione della proliferazione cellulare e l'apoptosi. Prende il nome da uno dei segnali chiave che lo compongono, la proteina chinasi *Hippo* (Hpo). Mutazioni di questo gene producono l'ipercrescita dei tessuti, chiamata anche fenotipo "*hippopotamus-like*". Questo *pathway* di segnalazione è coinvolto nel contenimento della proliferazione cellulare e nella promozione dell'apoptosi.

Nota 9. Numerose ricerche suggeriscono che i fattori ambientali siano in grado di apportare modifiche all'espressione genica, le quali vengono trasmesse dai genitori ai figli. L'epigenetica continua così a essere un tema di grande interesse: le modifiche epigenetiche non agiscono infatti sulla sequenza del DNA, ma cambiano il modo in cui questo è impacchettato e i geni vengono espressi. La memoria epigenetica può essere trasmessa da una generazione all'altra e di cellula in cellula durante lo sviluppo e la rigenerazione dei tessuti

Nota 10. Gli istoni sono proteine basiche che costituiscono la componente strutturale della cromatina. Risultano essere le più abbondanti proteine della cromatina andando a costituirne l'80-90% circa. Sono proteine basiche cariche positivamente, poiché posseggono un gran numero (circa il 20%) di amminoacidi con catena laterale basica, in particolare lisina e arginina. Gli istoni interagiscono con il DNA, che è carico negativamente a causa dell'abbondanza di gruppi fosfato, per formare strutture dette nucleosomi.

Nota 11. Lo zeugopodio è uno dei tre segmenti dell'arto pentadattilo (chiropterigio), anteriore e posteriore, dei Vertebrati Tetrapodi, e precisamente il segmento intermedio tra lo stilopodio, prossimale, e l'autopodio, distale. Lo scheletro dello zeugopodio è rappresentato da due ossa lunghe e parallele (radio e ulna) articolate da un lato con lo stilopodio, dall'altro con il basipodio dell'autopodio.

Nota 12. Lo stilopodio è il segmento prossimale degli arti anteriori e posteriori. Nel modello scheletrico del chiropterigio, lo stilopodio è costituito da un solo osso lungo (l'omero nell'arto anteriore, il femore in quello posteriore), articolato per diartrosi con le cinture corrispondenti, pettorale e pelvica.

Nota 13. *Interzone-like cells* sono un sottogruppo di cellule mesenchimali situate nel sito della futura articolazione. Queste cellule sono in stretta prossimità tra loro e connesse da *gap junction*. Producono ialuronano, polimero di disaccaridi che aumentano la fluidità della matrice extracellulare.

Nota 14. La catenina è una subunità del complesso proteico della caderina ed è il punto centrale del *pathway* Wnt/β-catenina, associato alla sopravvivenza cellulare. Le vie di segnalazione Wnt sono un insieme di vie di trasduzione del segnale attraverso proteine che trasmettono il segnale dall'esterno della cellula, attraverso recettori di superficie, all'interno della cellula.

Nota 15. *Elastica van Gieson* è una colorazione combinata per la visualizzazione, su un medesimo preparato, delle fibre elastiche, del connettivo, del collagene e dei nuclei. La tricromica di Van Gieson è il metodo maggiormente usato, in associazione con la colorazione di Weigert, per le fibre elastiche.

Bibliografia

- Borgens, R. B., Vanable, J. W.jr, Jaffe, L. F., 1979; Small artificial currents enhance Xenopus limb regeneration. Reproductive Biolohy, vol. 207: pp. 217-226
- Hayashi, S. Tamura, K. and Yokoyama, H., 2014; Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for Xenopus limb bud regeneration. Developmental Biology., vol. 388: pp. 57-67.
- Hayashi S., Kawaguchi A,, Uchiyama, I., Kawasumi-Kita A., Kobayashi, T., Nishide, H., Tsutsumi, R., Tsuru, K., Inoue, T., Ogino, H., Agata, K., Tamura, K., Yokoyama, H., 2015; Epigenetic modification maintains intrinsic limb-cell identity in Xenopus limb bud regeneration. Dev Biol. vol. 406(2): pp. 271-282.
- Maden, M., 1980; Intercalary regeneration in the amphibian limb and the rule of distal transformation. J. Embryol. Exp. Morphol, vol. 56: pp. 201-209.
- Nacu, E., 2010; Limb Regeneration: A New Development? Annual Review of Cell and Developmental Biology. Vol. 27: pp. 409-440
- Suzuki, M., Yakushiji, N., Nkada, Y., Saatoh, A., Ide, H., Tamura, K., 2006; Limb regeneration in Xenopus laevis froglet. ScientificWorldJournal, 6 Suppl. 1: pp. 26-37
- Tsutsumi, R., Inoue, T., Yamada, S. & Agata, K. ,2015;. Reintegration of the regenerated and the remaining tissues during joint regeneration in the newt *Cynops pyrrhogaster*. Regeneration, *vol*. 2*: pp*. 26–36.
- Tsutsumi, R., Yamada, S., Agata, K., 2016; Functional joint regeneration is achieved using reintegration mechanism in *Xenopus laevis*. Regeneration, vol. 3, issue 1: pp. 26-38
- Yokoyama, H., Yonei-Tamura, S., Endo, T., Ixpsua Belmonte, J. C., Tamura K., Ide, H., 2000; Mesenchyme with fgf-10 Expression is Responsible for Regenerative Capacity in Xenopus Limb Buds. Developmental Biology, vol. 219: pp. 18-29
- Yokoyama, H., Ide, H., Tamura, K., 2001: FGF-10 Stimulates Limb Regeneration Ability in Xenopus laevis. Developmental Biology, vol. 233: pp.72-79

Finito di stampare da

litos

Litos S.r.l. - Gianico (Bs)
www.litos.srl

nel mese di aprile 2017

ISBN 978-8-897-56216-0