

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Veterinarie**

Ciclo XXVII

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H2
Settore Scientifico disciplinare: VET/03**

**ANALISI D'IMMAGINE, PATOLOGIA QUANTITATIVA E
DIMENSIONE FRATTALE IN PATOLOGIA VETERINARIA:
DENSITÀ E FORME**

**Presentata da
CARLO BIANCO**

**Coordinatore Dottorato
Prof. CARLO TAMANINI**

**Relatore
Prof. GIUSEPPE SARLI**

Esame Finale Anno 2015

**-Dottorato di Ricerca in Scienze anatomopatologiche veterinarie-
XXVII Ciclo**

Dottorando: Carlo Bianco

Tutor: Prof. Giuseppe Sarli

RIASSUNTO TESI DI DOTTORATO

“Analisi d’immagine, patologia quantitativa e dimensione frattale in patologia veterinaria: densità e forme.”

Fino dagli albori della metodica scientifica, l’osservazione e la vista hanno giocato un ruolo fondamentale. La patologia è una scienza visiva, dove le forme, i colori, le interfacce e le architetture di organi, tessuti, cellule e componenti cellulari guidano l’occhio del patologo e ne indirizzano la scelta diagnostico-classificativa. L’osservazione del preparato istologico in microscopia ottica si attua mediante l’esame e la caratterizzazione di anomalie ad ingrandimenti progressivamente crescenti, a diverse scale spaziali, che partono dalla valutazione dell’assetto architettonico sovracellulare, per poi spostarsi ad investigare e descrivere le cellule e le peculiarità citomorfologiche delle stesse. A differenza di altri esami di laboratorio che sono pienamente quantificabili, l’analisi istologica è intrinsecamente soggettiva, e quindi incline ad un alto grado di variabilità nei risultati prodotti da differenti patologi. L’analisi d’immagine, l’estrazione da un’immagine digitale di contenuti utili, rappresenta una metodica oggettiva, valida e robusta ormai largamente impiegata a completamento del lavoro del patologo. Si sottolinea come l’analisi d’immagine possa essere vista come fase descrittiva quantitativa di preparati macroscopici e microscopici che poi viene seguita da una interpretazione. Nuovamente si sottolinea come questi descrittori siano oggettivi, ripetibili e riproducibili, e non soggetti a bassa concordanza inter operatore. La presente tesi si snoda attraverso un percorso concettuale orientato ad applicazioni di analisi d’immagine e patologia quantitativa che parte dalle applicazioni più elementari (densità, misure lineari), per arrivare a nozioni più avanzate, quali lo studio di complessità delle forme mediante l’analisi frattale e la quantificazione del pattern spaziale di strutture sovracellulari.

Le nozioni di analisi d’immagine più elementare e convenzionale sono state applicate in uno studio di immunoistochimica quantitativa volto a quantificare la densità di plasmacellule secernenti diversi isotipi di immunoglobuline e di plasmacellule secernente immunoglobuline antigene-specifiche nel contesto della lamina propria del piccolo intestino di suini (plasmacellule/10000 μ^2 lamina propria). Quest’ultima tecnica immunoistochimica “sandwich” è stata sviluppata ad hoc. Tale trial ha fornito densità di plasmacellule rapportate ad unità di superficie di lamina propria, arricchendo le referenze bibliografiche a riguardo; ed inoltre ha consentito di misurare la densità delle plasmacellule antigene specifiche in due gruppi di suini (vaccinati Ve non vaccinati NV) e le dinamiche temporali della densità delle stesse, confrontando due sottogruppi per ciascun gruppo di suini in due momenti diversi (NV= 10.55 ± 4.24 e 10.06 ± 5.01 plasmacellule/10000 μ^2 ; V= 9.37 ± 13.36 e 18.76 ± 15.83 plasmacellule/10000 μ^2), proponendo tale tecnica come metodica di quantificazione della immunità mucosale (Bianco *et al.*, Vet Immunol Immunopathol. 2014)

In altri due studi centrati sul cervelletto del cane, sono state usate metodiche convenzionali. In un primo studio è stato effettuato un confronto di parametri morfometrici macroscopici e microscopici del cervelletto di un cane con degenerazione cortico-cerebellare (DCC) con un soggetto sano della stessa età e peso vivo, allo scopo di quantificare la gravità e la distribuzione della lesione. La

metodica morfometrica del cane con DCC ha mostrato una significativa riduzione della densità lineare delle cellule del Purkinje (4.50 / mm), della densità delle cellule dello strato dei granuli (81.34 / 10000 μm^2) e un aumento di estensione della zona esprimente GFAP a livello di strato molecolare (gliosi reattiva) (40.28%) rispetto al cane normale (densità lineare delle cellule di Purkinje = 12.74 / mm, densità delle cellule dello strato dei granuli = 95.53 / 10000 μm^2 e GFAP = 34.68%). (Bianco *et al.*, Pak Vet J 2014).

Un secondo studio, effettuato presso il dipartimento di patologia veterinaria dell'Università di Liverpool orientato alla patologia veterinaria forense, è stato sviluppato per costruire una retta di stima dell'età di cuccioli di cane tra i 0 ed i 70 giorni di vita a partire dallo spessore dello strato esterno dei granuli del cervelletto, che nel corso di questo periodo scompare a seguito della migrazione centripeta dei neuroblasti che lo compongono, che vanno a formare lo strato dei granuli. Sono stati usati soggetti di varie razze ed età, privi di patologie cerebellari. Tale metodica può essere proposta come riferimento istologico quantitativo per il patologo veterinario quando sia necessaria una stima dell'età di cuccioli di cane (tra i 0 ed i 70gg). Il presente lavoro non è stato pubblicato, i dati pertanto sono da considerarsi preliminari.

Un terzo studio, puramente metodologico, ha quantificato la densità e la disposizione spaziale, attraverso l'indice di Clark-Evans, della componente vascolare evidenziata previa metodica immunohistochimica di un caso di oligodendroglioma del cane. Tale metodica viene spiegata e proposta per la quantificazione della disposizione spaziale bidimensionale di cellule o strutture sovracellulari in istologia. L'indice della componente vascolare neoplastica era pari a 1,34 (mediana), significativamente diverso ($p=0,02$) da quello del parenchima cerebrale normale (mediana=1,59). Tale descrittore di pattern spaziale indica una distribuzione omogenea dei profili vascolari, con una significativa tendenza alla disposizione casuale nel caso della vascolarizzazione dell'oligodendroglioma. Tale indicatore si rivela molto interessante perché correlato inversamente alla densità vascolare (Spearman $\rho=-0,53$; $p<0,05$), ovvero all'aumentare della densità vascolare i vasi tendono a disposizione casuale. Il presente lavoro non è stato pubblicato, i dati pertanto sono da considerarsi preliminari.

Successivamente sono stati adottati metodi di analisi d'immagine per il monitoraggio dell'apparato gastroenterico (fegato ed intestino) di pesci piatti allevati, per individuare il "punto di rottura" di una gestione dietetica o tecnica che induce una deriva patologica dallo stato di omeostasi.

Il parenchima epatico è stato valutato in termini di quantità di area epatocitaria occupata da fenomeni degenerativi e dal pattern di accumulo dei lipidi, previa analisi d'immagine (segmentazione dell'area occupata da vacuoli) e misurazione della dimensione frattale (FD) (pattern di accumulo). Tali metodi sono stati poi correlati con lo scoring istopatologico. La FD qui presentato può essere utile per interpretare la progressione del pattern di accumulo lipidico nel fegato di Solea, ma la misura della area coinvolta da accumulo di lipidi ha mostrato valori elevati di sensibilità e specificità se correlata allo scoring istologico (gold standard). La segmentazione di immagini istologiche del fegato di Solea senegalensis può essere proposto come metodo ancillare oggettivo da affiancare allo scoring istologico, e la percentuale del 55% può essere identificato come il limite tra accumulo grave (oltre il 55%) e lieve-moderato (inferiore al 55%) (Bianco *et al.*, The Fractal Laboratory Journal, 2013).

In un secondo studio indipendente è stato valutato il turnover dell'epitelio intestinale (metodica immunohistochimica ed analisi d'immagine), correlandolo con la dimensione frattale dei folds intestinali, rilevando come il cambiamento di dieta causi una risposta iperplastico-adattativa nell'intestino. Lo studio della dimensione frattale è stato proposto come valida alternativa alla metodica immunohistochimica di quantificazione in situ del turnover epiteliale enterocitario, e si è dimostrata tecnicamente ed economicamente efficiente, oltre che oggettiva. In particolare, le diete a totale sostituzione inducevano maggior proliferazione intestinale, con dimensione frattale=1,36 \pm 0,01, a

differenza delle diete “naturali”, la cui dimensione frattale era $1,33 \pm 0,03$. (Sirri, Bianco *et al.*, BMC Vet Res, 2014)

Uno studio, effettuato presso il dipartimento di patologia veterinaria dell’Università di Liverpool, è orientato alla patologia veterinaria forense. Tale trial ha voluto quantificare la gravità, previo metodo morfometrico, dell’atrofia muscolare indotta da *starvation* (nutrizione quantitativamente e qualitativamente inadeguata per periodi prolungati) nella specie canina, valutando inoltre le peculiarità istologiche. Tale trial ha fornito utili indicazioni quantitative e qualitative a supporto della patologia veterinaria forense. In particolare è stato identificato il valore cut-off di 25 micron del diametro feret minimo delle miofibre in grado di discriminare i soggetti con moderato o grave livello di atrofia da quelli normali. Altresì il livello moderato di atrofia muscolare ha dimostrato un livello di variabilità della solidità delle miofibre inferiore ai soggetti normali e con grave atrofia. I caratteri istopatologici qualitativi dell’atrofia da *starvation* sono i seguenti: edema, assenza di fibrosi, “nuclear clumping”, variabili livelli di profilo angoloide delle miofibre; raramente sono evidenziati foci di miofibrillolisi infiammatoria e non infiammatoria. Il presente lavoro non è stato pubblicato, i dati pertanto sono da considerarsi preliminari.

Uno studio interdisciplinare ha voluto quantificare e caratterizzare lo sviluppo differenziale di diversi segmenti della placenta equina mediante metodica morfometrica classica ed analisi frattale, poi confrontate con dati clinico-patologici. Tale trial ha permesso di quantificare il concetto di complessità dell’arborizzazione dei villi allantocoriali, spesso descritta qualitativamente in Letteratura e rappresenta il primo esempio di applicazione della metodica frattale nell’analisi dello sviluppo della placenta equina (Bianco *et al.*, Theriogenology 2014).

Successivamente è stata caratterizzata l’istopatologia e la patologia quantitativa della placenta di cani con correlazioni clinico patologiche, concentrandosi sulla stima della perfusione e sulla caratterizzazione dell’estensione delle lesioni riscontrate. Tale studio ha investigato correlazioni anche tra parametri istologici e quantitativi placentari con l’outcome neonatale. Il confronto della stima della densità dei vasi capillari del labirinto placentare non ha mostrato differenze significative tra i tre gruppi (sani, gruppo con outcome infausto e nati morti). La frequenza dei fenomeni degenerativo-necrotici a carico del labirinto placentare era significativamente diversa ($p=0,042$) tra i tre gruppi di soggetti, in particolare si evidenziava come nei soggetti nati morti ($n=6$), 5 mostravano fenomeni degenerativo necrotici da moderati a gravi, nei soggetti con outcome infausta ($n=7$), solo 3 erano caratterizzati da lesioni placentari necrotico degenerative moderate, e nei soggetti sani ($n=22$) solo 5 mostravano tali lesioni, con gravità variabile. Il presente lavoro non è stato pubblicato, i dati pertanto sono da considerarsi preliminari.

Infine, l’analisi di immagine è stata utilizzata per valutare, descrivere e quantificare il pattern di dispersione attraverso i tessuti molli di suini di diverse taglie (5-20 kg peso) di un vaccino inoculato attraverso un dispositivo senza ago (Needle-free injection device). Tale metodica ha consentito di valutare le conseguenze a livello tissutale delle dispersioni vaccinali a diversi regimi pressori. Si è identificato un pattern di dispersione mediante parametro morfometrico (\log_{10} perimetro/area) peculiare degli strati dermico-fasciale superficiale ($\log_{10} p/A$ mediana= 1,24; min=0,89 max=2,05) e interfasciale profondo-intermuscolare ($\log_{10} p/A$ mediana= 1,70; min=0,16 max=1,98); inoltre è stata riscontrata una maggiore frequenza di emorragie dermiche a livello di sito di inoculo. Il presente lavoro è stato pubblicato parzialmente. (Bianco e Vila, J Vaccines Vaccin. 2014).

INDICE

Capitolo 1

ISTOPATOLOGIA QUANTITATIVA DELLA PLACENTA EQUINA E DELLA PLACENTA CANINA CON CORRELAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE: PARAMETRI MORFOMETRICI CLASSICI E DIMENSIONE FRATTALE

PRIMA SEZIONE

Parametri istomorfometrici e dimensione frattale della placenta equina di puledri con outcome positivo e negativo.....	11
Introduzione	13
Materiali e metodi	15
Selezione della casistica.....	15
Raccolta dei dati.....	15
Analisi statistica	16
Risultati	17
Discussione	22
Conclusioni	24

SECONDA SEZIONE

Reperti istologici, densità microvascolare e patologia placentare spontanea in cani convenzionali: correlazioni clinico patologiche.....	25
Introduzione	25
Materiali e metodi	26
Morfometria ed istopatologica.....	27
Analisi statistica	27
Risultati	27
Istopatologia.....	28
Discussione	36
Bibliografia	41

Capitolo 2

ISTOPATOLOGIA QUANTITATIVA APPLICATA ALLA NEUROPATOLOGIA VETERINARIA: ABIOTROFIA CEREBELLARE CANINA, ISTOMORFOMETRIA CEREBELLARE NEONATALE CANINA PER DETERMINAZIONE DELL'ETA IN PATOLOGIA VETERINARIA FORENSE E QUANTIFICAZIONE DI PATTERN SPAZIALE MICROVASCOLARE IN UN CASO DI OLIGODENDROGLIOMA CANINO

PRIMA SEZIONE	47
Introduzione	49
Materiali e metodi	49
Animali	49
Istologia, istochimica ed immunoistochimica.....	50
Morfometria	50
Risultati	51
Discussione	55
SECONDA SEZIONE	56
Introduzione	56
Materiali e metodi	57
Selezione della casistica.....	57
Analisi d'immagine.....	57
Analisi statistica	57
Risultati	58
TERZA SEZIONE	
Indice di Clark-Evans come indicatore sintetico di disposizione spaziale della componete microvascolare tumorale: applicazione in un caso di oligodendroglioma di cane.....	63
Introduzione	63
Materiali e metodi	64
Analisi statistica	65
Risultati	65
Discussione	66
Bibliografia	68

Capitolo 3

ISTOPATOLOGIA QUANTITATIVA APPLICATA ALLA VALUTAZIONE DELLE PATOLOGIE IPERPLASTICO-DEGENERATIVE ADATTATIVE DEL TRATTO ENTERICO E DEL PARENCHIMA EPATICO IN PESCI PIATTI ALLEVATI

PRIMA SEZIONE	71
Proliferazione, apoptosi, ed analisi della dimensione frattale per la quantificazione del trofismo intestinale in Solea solea alimentata con diete a base di farina di mitili.....	73
Introduzione	73
Materiali e metodi	73
Dimensione frattale	76
Analisi statistica	76
Risultati	76
Discussione	79
SECONDA SEZIONE	82
Metodi	83
Statistica	83
Risultati	84
Discussione	87
Conclusioni	88
Bibliografia:	89

Capitolo 4

QUANTIFICAZIONE ATTRAVERSO IMMUNOISTOCHEMICA ED ANALISI D'IMMAGINE DI PLASMACELLULE SECERNENTI IGA, IGM, IGG ED IMMUNOGLOBULINE ANTI PORCINE CIRCOVIRUS 2 (PCV-2) NELLA LAMINA PROPRIA DEI TRATTI INTESTINALE E GENITALE DELLA SPECIE SUINA: STRUMENTO DI STUDIO QUANTITATIVO DELL'IMMUNITÀ MUCOSALE.

Introduzione	93
Materiali e metodi	97
Casistica e campionamento	97
Istologia ed immunoistochimica	97
Analisi quantitativa delle plasmacellule	99

Analisi statistica	99
Risultati	100
Discussione	104
Addendum	
Considerazioni sullo staining pattern extracellulare di anticorpi anti IgA, -IgG, IgM suino e sulla metodica sandwich: risultati qualitativi di staining dell'utero suino	107
Risultati	107
Discussione	109
Bibliografia	111

Capitolo 5

ISTOPATOLOGIA QUANTITATIVA E CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE DELLA ATROFIA MUSCOLARE DEL MUSCOLO SCHELETRICO INDOTTA DA “STARVATION” NELLA SPECIE CANINA: IMPLICAZIONI RILEVANTI IN CAMPO FORENSE

“Histopathology and quantitative pathology of skeletal muscle in starved dogs: relevant forensic oriented findings”	117
Introduzione	117
Materiali e metodi	118
Selezione della casistica.....	118
Istopatologia, analisi di immagine e patologia quantitativa.....	119
Analisi statistica	120
Risultati	120
Discussione	123
Bibliografia	128

Capitolo 6

METODO “SCANNER-FOTOGRAFICO” PER LA QUANTIFICAZIONE DELLA PENETRAZIONE E DEL PATTERN DI DISPERSIONE ATTRAVERSO I TESSUTI MOLLI DI UN VACCINO SOMMINISTRATO MEDIANTE NEEDLE FREE INJECTION DEVICE (NFID) NELLA SPECIE SUINA.

Introduzione	133
Principio di funzionamento NFID con riferimento a quelli utilizzati in medicina veterinaria	133
Modelli in vitro di dispersione di farmaci somministrati con NFID.....	135
Descrizione istologica stratigrafica e biomeccanica dei tessuti molli della specie suina	136
La cute nella specie suina.....	136
Descrizione istologica	136
Il sottocute, il sistema fasciale e muscolare nella specie suina.....	137
Descrizione istologica	137
Caratteristiche biomeccaniche dei tessuti molli	138
Obiettivi	139
Trial design	140
Animali	140
NFID e vaccinazione	140
Scanner photography ed analisi di immagine	141
Analisi statistica	141
Risultati	142
Prova <i>in vivo</i>	143
Descrizione macroscopica dei pattern di dispersione del vaccino somministrato mediante NFID..	144
Discussione	155
Bibliografia	158

Capitolo 1

ISTOPATOLOGIA QUANTITATIVA DELLA PLACENTA EQUINA E DELLA PLACENTA CANINA CON CORRELAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE: PARAMETRI MORFOMETRICI CLASSICI E DIMENSIONE FRATTALE

Prima Sezione

Premessa

La prima sezione del presente capitolo è basata sulla pubblicazione:

Bianco C, Pirrone A, Boldini S, Sarli G, Castagnetti C. Histomorphometric parameters and fractal complexity of the equine placenta from healthy and sick foals. *Theriogenology*. 2014;82(8):1106-

Parametri istomorfometrici e dimensione frattale della placenta equina di puledri con outcome positivo e negativo

Introduzione

La placenta viene definita come “diario della vita intrauterina”. Esso è un organo unico, transitorio e vitale per lo sviluppo del feto o dei feti. Una seconda definizione, molto efficace e comunicativa, la indica come “*life-line*” (Ray 2010). Essa mostra nelle specie di interesse veterinario arrangiamenti architettonico strutturali e funzionali quanto mai variabili (Veggetti, 1982; Barone, 2003). La placenta è un organo “trascurato”, considerando quanto sia importante la sua funzione prima della nascita. Se questo è vero per le placente umane, è ancor più vero per le placente animali. Esse non sono solo difficili da ottenere, ma sono così varie nel loro aspetto che spesso sono difficili da esaminare. È forse anche per questo motivo che ci sono poche informazioni sulle caratteristiche patologiche delle placente di molte specie animali (<http://placentation.ucsd.edu/homefs.html>, accesso 12 dicembre 2014). Grosser (1927) e Kaufmann (1983) hanno affermato che la placenta è probabilmente l’organo con la struttura più variabile di ogni altro organo dei mammiferi. Le funzioni della placenta sono di scambio di sostanze nutritive e cataboliti, di produzione di ormoni, di trasferimento di immunoglobuline e di detossificazione, oltre ad azione di stabilizzazione meccanica e protezione del feto. La formazione corretta della placenta è quindi essenziale per lo sviluppo del feto e per una gravidanza normale. Nell’uomo la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare sono le forze trainanti del processo di placentazione, determinando il destino delle cellule del trofoblasto. Anomalie in qualsiasi fase di questo sviluppo, a causa di alterata proliferazione, differenziazione o morte cellulare possono portare a funzione placentare impropria o patologica e conseguenti complicazioni legate alla gravidanza (Ray, 2010). La placenta è l’unico esempio in patologia di campione che fornisce informazioni su due pazienti (madre e conceptus) (Lewis e Benirschke, 2007).

Il corretto, equilibrato ed armonico sviluppo fetale sono direttamente influenzati dalla sviluppo e dalla la funzione della placenta. La placenta garantisce lo scambio di gas essenziali, nutrienti e prodotti di scarto tra feto e madre. La placenta equina è di tipo diffuso ed epiteliochoriale Il trofoblasto è organizzato in villi coriali moderatamente ramificati che si interdigitano con l’epitelio endometriale

costituendo microcotiledoni. Essi coprono quasi l'intera superficie della placenta, conferendole un aspetto che viene definito vellutato (Amoroso, 1952; Steven, 1982; Samuel *et al.*, 1975; Samuel *et al.*, 1977; Regnault *et al.*, 2002; Wilsher e Allen; 2003). Anomalie morfologiche o funzionali della placenta possono essere associate con un deficit maturativo fetale (Collins, 1994; Morresey, 2004; Rossdale, 2004). La placenta è stata descritta come un "diario della vita intrauterina" e ha il potenziale di far luce su molti processi che si verificano durante la vita intrauterina (Redline, 2008). La valutazione macroscopica della placenta dovrebbe essere parte integrante dell'esame clinico-ostetrico post-partum della parturiente. Le informazioni ottenute da detto esame possono dare indicazioni rilevanti sulla gestione immediata del puledro neonato (Morresey, 2004). Un aspetto istologico anomalo della placenta è più strettamente associato con anomalie del puledro che la percentuale di area placentare coinvolta dal processo patologico citato (Cottrill *et al.*, 1991). Gli studi morfometrici della placenta equina hanno utilizzato la microscopia ottica (ematossilina eosina e tecnica immunoistochimica), la microscopia elettronica e le tecniche stereologiche, investigazioni che sono state utilizzate per studiarne lo sviluppo e le correlazioni clinico patologiche (Samuel *et al.*, 1974; Leiser *et al.*, 1998; Gerstenberg *et al.*, 1999; Macdonald *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2002; Veronesi *et al.*, 2005). L'analisi d'immagine, in campo istologico, elimina la soggettività dell'esame e rende più rapido l'esame istologico stesso. L'analisi d'immagine è stata largamente usata dalle scienze biomediche tra cui l'oncologia, le neuroscienze e l'ostetricia (Bertram e Rogers, 1981; Tambasco *et al.*, 2010; Urso-Baiarda e Grobbelaar, 2006). Ducray (2011) ha utilizzato strumenti morfometrici ed analisi d'immagine per studiare le caratteristiche della componente fetale della placenta in donne normotese e donne con quadri di preeclampsia. La geometria frattale e l'analisi della dimensione frattale rappresentano un insieme di tecniche per quantificare la complessità insita nelle forme e nei processi biologici (Eke *et al.*, 2002; Losa, 2009; Mandelbrot, 1982). La dimensione frattale, in particolare, è una misura adimensionale delle modalità con cui un oggetto o una struttura riempiono lo spazio (space filling capacity), altrimenti può essere interpretata come una quantificazione delle complessità strutturali di una forma. L'analisi della dimensione frattale (FD) è stata utilizzata per valutare lo sviluppo dei villi placentari in donne con gravidanze fisiologiche e patologiche (Wielgus *et al.*, 2000; Arora e Dey, 2011). Lo scopo del presente studio è stato quello di utilizzare metodi di analisi d'immagine e analisi della dimensione frattale per indagare i parametri istomorfometrici e la complessità della placenta equina di puledri con outcome positivo (sani=Healthy=H) e con outcome negativo (Sick=S).

Materiali e metodi

Selezione della casistica

Quattordici placenti provenienti da 30 fattrici sono state selezionate nella stagione riproduttiva 2013 e sono stati divisi in due gruppi: sette cavalle con gravidanza normale, parto eutocico e puledri sani (gruppo 1) e sette cavalle con gravidanza normale o a rischio, parto eutocico e puledri con outcome negativo (gruppo 2). Cinque cavalle sono state escluse dallo studio a causa di distocia, cinque a causa di ritenzione di placenta (espulsione avvenuta dopo 3 ore dalla nascita), e sei perché il campionamento per la processazione istologica è stato tardivo, ed i preparati istologici sono stati ritenuti non ottimali per l'analisi d'immagine. Gli animali sono stati ricoverati a circa 310 giorni di gravidanza e rimaste sotto osservazione per almeno 7 giorni dopo il parto. Le cavalle sono state stabulate in box su paglia, con alimentazione a base di fieno *ad libitum* e concentrati due volte/giorno; era inoltre consentito l'accesso diurno ad area di pascolamento apposita. I puledri sono stati classificati come sani (Gruppo 1) quando avevano un esame clinico nei limiti della norma, un esame emocromocitometrico completo nella norma e alla nascita e una concentrazione sierica di IgG ≤ 800 mg / dL a 18 ore di vita. Nel Gruppo 2 puledri sono stati classificati soggetti con sindrome da asfissia perinatale e disfunzioni neurologiche, in assenza di meningite o traumi (Knottenbelt *et al.*, 2004). Segni clinici comuni includono perdita o assenza del riflesso di suzione, inadeguato comportamento di ricerca del capezzolo, disfagia, convulsioni, iperreattività e debolezza (Castagnetti *et al.*, 2010). I puledri nati prima di 320 giorni sono stati definiti prematuri, quelli nati dopo 320 giorni con caratteristiche fisiche di immaturità sono stati definiti dismaturi (Knottenbelt *et al.*, 2004). Tutte le procedure e le manualità effettuate sugli animali sono state effettuate con il nulla osta del Comitato Etico della Facoltà di Veterinaria Medicina, Università di Bologna, in accordo con Legge 116 / 92, approvato dal Ministero della Salute. Inoltre i proprietari hanno dato il loro consenso.

Raccolta dei dati

I seguenti dati sono stati registrati per ogni fattrice: l'età, la parità, la lunghezza della gravidanza (giorni), il tempo di espulsione placentare (minuti), le anomalie placentari rilevate macroscopicamente (aree prive di villi, emorragie, variazioni del peso). Il peso della placenta è stato considerato normale quando era il 10-11% del peso del puledro (Cottrill, 1991). Le caratteristiche macroscopiche delle placenti sono presentate nella tabella 1. I seguenti dati e parametri sono stati registrati per ogni puledro alla nascita: Apgar score (Vaala *et al.*, 2002), la durata del parto (minuti), la concentrazione di

glucosio e lattato ematico, proteine sieriche totali, fibrinogeno plasmatico, creatinina sierica, urea, emoglobina (g/l), globuli rossi, ematocrito, globuli bianchi, formula leucocitaria, conta piastrinica, volume corpuscolare medio (fl), emoglobina corpuscolare, malattie durante il ricovero ed exitus. Entro 10 minuti dalla nascita il puledro è stato sottoposto a prelievo ematico a livello di giugulare. I parametri ematobiochimici sono stati valutati mediante test standard (Castagnetti *et al.*, 2010). I soggetti appartenenti al gruppo 2 sono stati inoltre soggetti ad emocoltura. La placenta è stata pesata ed esaminata nella disposizione ad F immediatamente dopo l'espulsione, (Cottrill *et al.*, 1991; Morresey, 2004). Un campione di placenta è stato prelevato e fissato in formalina tamponata al 10% da ciascuna placenta a livello di corpo (B=body), corno gravido (PH=pregnant horn) e corno non gravido (NPH=non pregnant horn). Successivamente i campioni sono stati inclusi in paraffina e processati per ottenere preparati istologici di routine (colorazione ematossilina-eosina). Successivamente sono state ottenute fotografie (13-17) dei preparati microscopici codificati, ad ingrandimento 200x (area campo= 246970 μ^2), mediante un microscopio Leica ed una fotocamera Leica dfc 320 (Leica Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße 17-37 Wetzlar, Germany) (specifiche foto: B/W; 2088 x1550 pixel, jpeg). Le procedure istomorfometriche ed il calcolo della box-counting FD sono state effettuate con Imagej1.45 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). L'elaborazione delle immagini è stata effettuata con una macro sviluppata ad hoc eseguita in modalità batch. Brevemente, le immagini sono state segmentate e binarizzate, per poi procedere ad un'analisi morfometrica utilizzando la funzione analyze particles di Imagej. I parametri misurati sono stati i seguenti: area totale dei villi, area media dei villi, perimetro medio dei villi e numero di villi per campo microscopico. Le immagini binarizzate ottenute ed utilizzate per la fase di analisi morfometrica sono state ulteriormente manipolate per ottenerne l'outline e sono state sottoposte ad analisi della box-counting FD con Imagej, con una seconda macro sviluppata ad hoc. La macro è stata preliminarmente testata con immagini sviluppate ad hoc (campo pieno, campo vuoto, cerchio di dimensione nota, e frattale matematico con FD nota (Serpinsky gasket)).

Analisi statistica

La distribuzione dei dati è stata analizzata con test di Kolmogorov-Smirnov. Dal momento che i dati mostravano distribuzione non normale, sono stati condotti test non parametrici. E' stato effettuato un test del Chi quadrato per valutare l'associazione della valutazione macroscopica post partum della placenta (esame macroscopico nei limiti della norma o patologico) e l'outcome del puledro (positivo o negativo). Il valore predittivo che ha l'esame macroscopico della placenta sull'outcome del puledro è

stato calcolato mediante metodi illustrati in Center for Evidence-Based Medicine; www.cebm.net. Si è proceduto al calcolo di sensibilità (Se), specificità (Sp) e dell'odd ratio.

Per valutare le differenze tra le tre aree campionate (B, NPH, e PH) il test di Kruskal-Wallis con correzione post-hoc di Bonferroni è stata eseguito in ciascun gruppo di puledri, con outcome positivo (gruppo 1) ed outcome negativo (gruppo 2). Il Mann-Whitney U-test è stato invece utilizzato per confrontare i parametri istomorfometrici e la FD della placenta, nonché i dati clinico-anamnestici e laboratoristici. La correlazione per ranghi di Spearman è stata utilizzata per analizzare le relazioni tra parametri istomorfometrici, FD e dati clinico-patologici. I valori medi dei parametri istomorfometrici e della FD dei tre segmenti di placenta sono stati calcolati e correlati con i parametri clinici, in quanto l'unità placentare è composta dai tre segmenti anatomici. Le statistiche descrittive adottate sono state le seguenti: mediana, 25° e 75° percentile. Il valore di p inferiore a 0,05 è stato settato ad indicare la significatività statistica. L'analisi statistica è stata condotta con il software SPSS, version 20.0, (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Risultati

Le razze equine incluse nella casistica riflettono la popolazione locale italiana: trottatore (n=9), Sella Italiano (n=3) e Quarter horse (n=2). Quattro fattrici del gruppo 2 hanno avuto una gravidanza a rischio in base ai dati anamnestici od ai reperti ecografici (Bracher *et al.*, 1996; Renaudin *et al.*, 1997). Due di queste fattrici hanno mostrato ecograficamente una diminuita vitalità fetale contestuale ad una bassa reattività cardiaca ed ad anomalie placentari. Le altre due fattrici invece presentavano rischio di tipo anamnestico. Clinicamente i puledri inclusi nel Gruppo 2 hanno mostrato: sindrome di asfissia perinatale (n=4), prematurità/dismaturità (n=2), ed in un caso entrambi tali quadri (n=1). L'emocoltura di tali soggetti ha dato esito negativo. Un soggetto prematuro del gruppo 2 è stato sottoposto ad eutanasia a causa della prognosi infausta. Tutti i puledri facenti parte del gruppo 1 (100%) sono stati dimessi. I dati sono presentati nella tabella 1.

	Gruppo 1	Gruppo 2
	Mediana (25°-75°)	Mediana (25°-75°)
Età fattrice (anni)	12 (8 – 17)	13 (8 – 16)
Numero della gravidanza	2 (1 – 3)	2 (1 – 10)
Lunghezza gravidanza (gg)	340 (317 – 345)	339 (328 – 370)
Peso placenta (kg)	5,20 (4,50 – 5,70)	4,00 (3,65 – 5,50)
Peso puledro (kg)	50,00 (42,62 – 57,25)	39,00 (36,25 – 47,87)
Apgar score	9 (8-10)	8 (7-9)

Tabella 1: Dati clinici dei due gruppi. Non sono state evidenziate differenze significative.

L'esame macroscopico post partum della placenta ha definito 7 su 14 placenti come patologiche, tra cui quattro con ipoplasia dei villi diffusa ed aumento di peso, e tre con ipoplasia dei villi e peso ridotto). Il gruppo 1 mostrava una placenta non nei limiti della norma (14,28%), mentre nel gruppo 2 sei (85,72%) placenti mostravano lesioni. Il test del Chi-quadrato ha evidenziato una significativa associazione tra le lesioni macroscopiche della placenta e l'outcome del puledro ($p=0,008$). La valutazione macroscopica della placenta ha mostrato buona sensibilità (86%) e specificità (86%) nel predire l'outcome del puledro (odds ratio 36,00 95% intervallo di confidenza 95%; 1,80 - 718,68). La macro sviluppata per l'analisi di immagine ha dimostrato efficienza nella misurazione delle immagini test: un campo completamente vuoto è stato identificato come sfondo senza particelle; un campo nero è stato identificato come foreground; un cerchio di dimensioni note è stato identificato correttamente e misurato, la FD del sierpinsky gasket FD è stata quantificata correttamente, con l'ottenimento di un valore leggermente inferiore al valore matematico a causa dell'effetto della risoluzione dell'immagine. I parametri morfometrici e la FD dei tre segmenti di placenta sono presentati in tabella 2. Come indicato nella tabella 2, il test di Kruskal-Wallis ha evidenziato differenze statisticamente significative della superficie totale dei villi ($p= 0,002$), della dell'area villi media ($p= 0,047$) tra i tre segmenti (B, PH, e NPH) nel gruppo 1. Nel gruppo 2 sono state evidenziate differenze significative del numero di villi per campo ($p=0,0000$), della superficie totale dei villi ($p=0,000$) ed della FD ($p=0,000$).

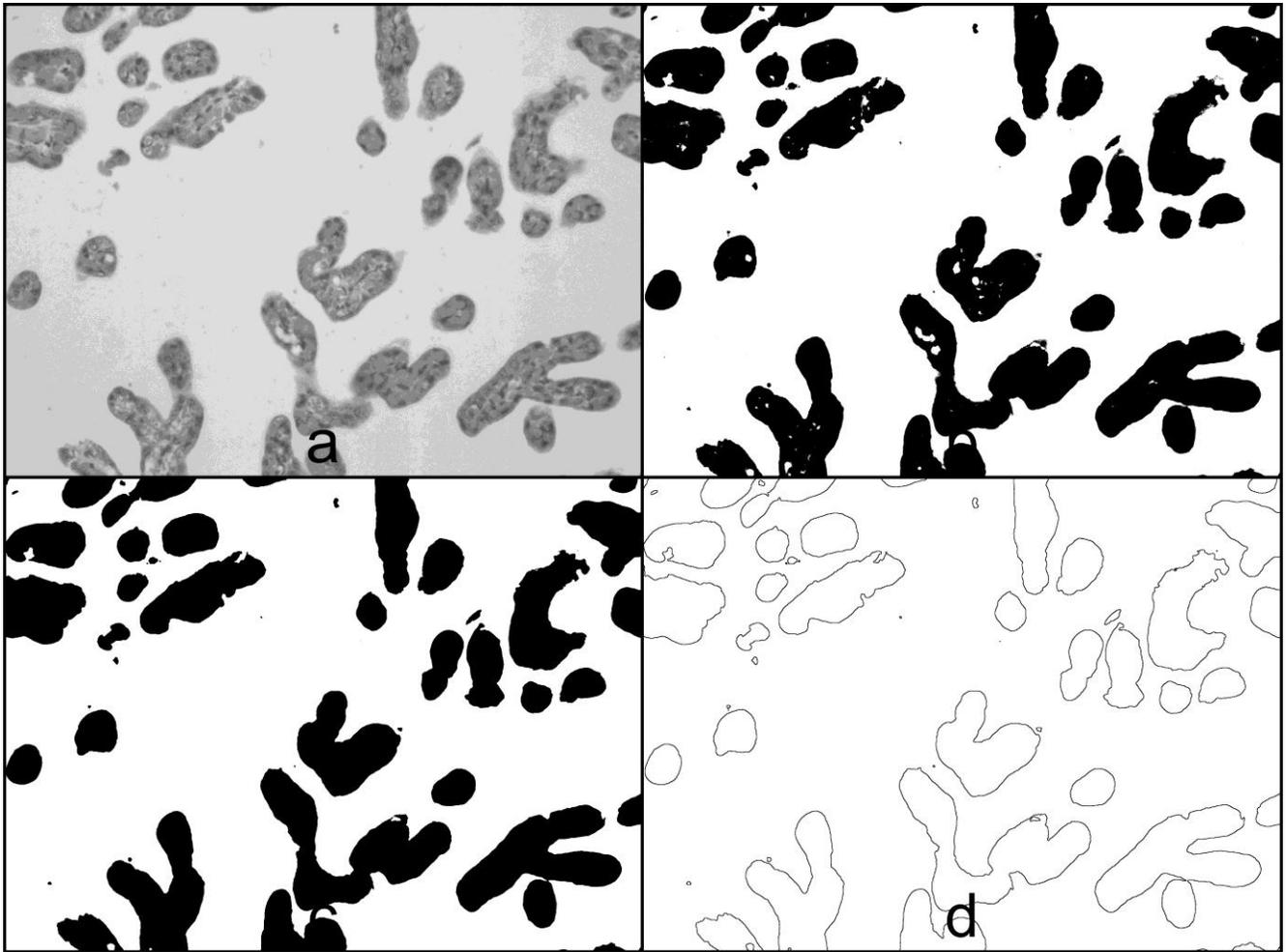


Figura 1: Esempio di processazione dell'immagine microscopica di villi placentari. a-immagine originale (b/w, Obj=20x; b-immagine binarizzata ottenuta tramite segmentazione; c- completamento delle segmentazione; d- estrazione dell'outline per il calcolo della dimensione frattale.

Il test di Mann-Whitney, utilizzato per il confronto dei segmenti di placenta tra i due gruppi, ha identificato una differenza significativa del numero di villi per campo a livello di corpo (B) ($p=0,042$); sono state identificate differenze significative nel corno non gravido (NPH) per quanto riguarda il numero di villi per campo ($p=0,001$), la FD ($p=0,004$) e la superficie totale dei villi ($p=0,013$); il confronto del corno gravido (PH) non ha rilevato differenze tra i due gruppi. Il corpo ed il corno gravido mostravano valori superiori nei puledri con outcome positivo (gruppo 1), mentre la situazione era opposta a livello di corno non gravido, cioè le placente dei puledri del gruppo 2 avevano valori superiori nel corno non gravido. Il confronto dei dati anamnestici e laboratoristici non evidenziava differenze tra i due gruppi. Il test di Spearman evidenziava correlazioni moderate o forti tra i valori

medi dei tre segmenti di placenta (B, PH, e NPH) ed i dati clinico-laboratoristici. L'area totale occupata dai villi era correlata al MCHC ($r = -0,687$; $p = 0,014$) ed alla concentrazione sierica di urea ($r = 0,655$; $p = 0,029$); l'area media dei villi mostrava correlazione con la concentrazione ematica di lattato ($r = 0,578$; $p = 0,03$) ed MCHC ($r = -0,599$; $p = 0,04$); il perimetro medio dei villi era correlato al MCHC ($r = -0,725$; $p = 0,008$) ed alla concentrazione sierica di urea ($r = 0,818$; $p = 0,002$). Il medesimo test ha inoltre evidenziato correlazione negativa tra Apgar score ed FD ($r = -0,564$; $p = 0,036$) ed una correlazione positiva tra FD ed ematocrito ($r = 0,592$; $p = 0,042$), MCHC ($r = 0,726$; $p = 0,007$), e la concentrazione sierica di urea ($r = 0,885$; $p = 0,000$).

Tabella 2 (pagina seguente): Parametri morfometrici e dimensione frattale dei tre segmenti di placenta (B= corpo; PG= corno gravido; NPH= corno non gravido), presentati per ciascun gruppo. Le lettere diverse all'apice³ indicano differenze statisticamente significative entro gruppo nel gruppo 1, I numeri diversi all'apice indicano differenze statisticamente significative entro gruppo nel gruppo 2.

	Gruppo 1			Gruppo 2		
	Mediana (25°-75°)			Mediana (25°-75°)		
	B	PH	NPH	B	PH	NPH
Numero di villi/ campo	31,00	32,00	31,00	28,00 ¹	32,00 ²	36,00 ²
microscopico	(22,00-40,00)	(26,00-41,00)	(23,00-39,00)	(18,25 - 36,00)	(25,50-38,50)	(28,00-42,00)
Area totale dei villi	64100,39 ^a	77039,32 ^b	66684,53 ^{ab}	54659,60 ¹	68594,57 ²	77711,19 ³
(μ²)	(43010,68 -83973,41)	(56114,93-97031,46)	(47964,78-95292,65)	(34559,48 -80370,78)	(51528,14-83199,50)	(60296,03-96769,19)
Area media dei villi	199,00 ^a	217,00 ^a	211,00 ^a	199,00	209,00	209,00
(μ²)	(166,00 - 242,00)	(171,00-293,00)	(166,00-298,00)	(156,25 - 292,00)	(165,00-282,00)	(167,00-288,50)
Perimetro medio dei villi	279,00	284,00	292,00	291,00	275,00	280,50
(μ)	(243,00-324,00)	(245,00-345,00)	(251,50-365,50)	(241,00 - 358,75)	(240,50-348,00)	(238,25-350,75)
Dimensione frattale	1,36	1,37	1,37	1,37 ¹	1,36 ¹	1,39 ²
(FD)	(1,32 - 1,40)	(1,33-1,40)	(1,32-1,41)	(1,30- 1,40)	(1,33-1,40)	(1,36-1,42)

Discussione

L'esame della placenta dovrebbe costituire parte integrante della valutazione clinica della fattrice e del puledro nel post partum. Eventuali segni di anomalie della placenta possono essere identificati durante l'esame macroscopico della placenta e possono dare utili indicazioni su imminenti problematiche perinatali. La superficie allantocoriale può essere vista come una immagine speculare della superficie endometriale materna, e dunque ne possono indicare lo stato di salute, ed eventualmente dare indicazioni sulla capacità della fattrice di portare a termine nuove gravidanze. Inoltre, le membrane placentari sono di pertinenza fetale e possono fornire informazioni sul puledro (feto o neonato) che potrebbe essere difficile identificare durante l'esame clinico del neonato. Gli esami microscopico e macroscopico della placenta non sono solo importanti per individuare eventuali processi infiammatori (placentite), ma anche per valutare lo sviluppo dei villi e l'area di scambio materno-fetale (Bracher *et al.*, 1996). Il presente studio rappresenta la prima indagine in medicina veterinaria che ha utilizzato l'analisi frattale per valutare il grado di complessità e sviluppo dell'arborizzazione dei villi allantocoriali della specie equina. L'efficienza dell'analisi frattale per valutare la placenta umana è stato evidenziato da diversi autori (Cross *et al.*, 1994; Wielgus *et al.*, 2000; Arora e Dey, 2011). L'area funzionale dell'interfaccia materno-fetale è il fattore più importante per stabilire un adeguato scambio placentare (Amoroso, 1952), mentre la struttura istologico-strutturale elementare della placenta è il villo, e di conseguenza lo studio di tale struttura è alla base dello studio istologico della placenta. È noto infatti che lo sviluppo quantitativamente insufficiente dell'arborizzazione dei villi nelle placente di tipo epitelio-coriale degli animali domestici è una causa di compromissione dello sviluppo fetale (Amoroso, 1952; Allen *et al.*, 2002). Il presente studio ha quantificato i parametri istomorfometrici della placenta equina. L'analisi d'immagine si è dimostrata affidabile e efficiente nella segmentazione e nel calcolo dei parametri morfometrici e della FD dei villi e delle immagini test. La performance della metodica analitica è dovuta alla sovrapposizione, nel presente studio, di visione umana e della computer vision, o meglio è noto che la percezione visiva umana estrae, quando osserva, le informazioni salienti di una scena e raramente pone attenzione a zone vuote (prive di senso) (Duncan, 1984). Il sistema percettivo visivo umano è molto efficace nel riconoscere oggetti, ma assai carente nella misura delle tonalità dei colori, delle distanze e delle aree (Jähnem 2002); la visione umana viene definita object based. Al contrario la computer vision è fondata sul pixel e sui rapporti intercorrenti tra pixel adiacenti. L'aspetto microscopico della placenta offre intrinsecamente una differenza tra gli oggetti di interesse (villi=foreground) e sfondo (background = spazio tra i villi), di conseguenza la segmentazione mediante tresholding è altamente efficiente nella partizione di oggetti di interesse e

background. Lo sviluppo dei villi della placenta equina mostra una crescente complessità durante lo sviluppo gestazionale fino al momento del parto (Macdonald *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2002; Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). Il presente studio ha quantificato tale complessità mediante calcolo della FD. Inoltre, lo studio ha valutato i tre segmenti della placenta e la placenta nella sua interezza, come unità funzionale. Dai dati presentati (parametri morfometrici ed FD) si apprezza uno sviluppo uniforme dei villi nelle placente appartenenti al gruppo 1, eccezion fatta per la superficie totale dei villi nel corno gravido (PH). Tali descrittori quantitativi possono essere interpretati come indicatori di uno sviluppo armonico della placenta. Al contrario nelle placente dei puledri con outcome negativo (gruppo 2), è stato evidenziato un maggiore sviluppo dei villi a livello di corno, ed una FD maggiore a livello di corno non gravido. Questo pattern di crescita non uniforme, come rivelato da parametri morfometrici euclidei e dalla FD (capacità di riempimento dello spazio) può essere interpretato come una crescita compensatoria a livello di corno e soprattutto di corno non gravido. La maggiore complessità misurata con la FD nel corno non gravido potrebbe essere interpretato come un tentativo di compenso, come suggerito da Wielgus *et al.* (2000) che ha quantificato una maggiore FD nelle placente di donne fumatrici, rispetto a donne non fumatrici. Lo stesso meccanismo compensatorio è stato dimostrato nella componente vascolare placentare ovina ed umana, in corso di ipossia cronica con l'induzione di un aumento espressione del fattore di crescita vascolare endoteliale ed un aumento del numero di capillari (Collins, 1993; Cheung, 1993; Matsumoto *et al.*, 2002). Le correlazioni tra parametri morfometrici e variabili clinico-patologiche hanno evidenziato una moderata correlazione positiva del lattato ematico con area media dei villi; alla luce del fatto che la lattatemia è influenzata dalla modalità del parto (Pirrone *et al.*, 2012) e non dall'efficienza placentare, tale correlazione non viene ritenuta biologicamente significativa. Lo sviluppo dei villi (superficie totale villi, area media dei villi, e perimetro medio dei villi) era correlato negativamente alla MCHC, e la FD era positivamente correlata alla MCHC ed ematocrito. Questi risultati suggeriscono che i feti con la placente con scarso sviluppo dei villi e maggiore complessità rispondono, con finalità puramente compensatoria adattativa, con un incremento di MCHC ed ematocrito. E' noto che l'ipossia uterina cronica nella donna induce aumento di eritropoietina e incremento di eritropoiesi nel feto (Ruth *et al.*, 1990). L'eritrocitosi, come conseguenza di eritropoiesi incrementata, è stata riportata anche in puledri neonati con ipossia da insufficienza placentare o placentite (Axon e Palmer, 2008). Infine, la correlazione negativa tra Apgar score (indicatore di ipossia neonatale) ed FD, suggerisce che le placente dei puledri con outcome negativo mostrano un pattern di sviluppo differenziale segmentale tendenzialmente più complesso, con finalità compensatoria.

Conclusioni

L'analisi morfometrica, particolarmente la quantificazione della dimensione frattale, può essere proposto come strumento istologico quantitativo nella valutazione istopatologica della placenta equine. La crescita differenziale segmentale della placenta equina nei puledri con outcome negativo ha evidenziato una risposta plastica adattativa locale della placenta. Deriva da quest'ultima considerazione che l'indicazione dell'area di campionamento della placenta è una fondamentale informazione per l'esame istopatologico.

Seconda Sezione

Reperti istologici, densità microvascolare e patologia placentare spontanea in cani convenzionali: correlazioni clinico patologiche.

Introduzione

La formazione corretta della placenta è essenziale per lo sviluppo del feto e per una gravidanza normale. Negli esseri umani, la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare sono le forze trainanti del processo di placentazione, determinando il destino delle cellule del trofoblasto. Anomalie in qualsiasi fase di questo sviluppo, a causa di alterata proliferazione, differenziazione o morte cellulare può portare a funzione placentare impropria o patologica e conseguenti complicazioni legate alla gravidanza (Ray, 2010). Si ritiene attualmente che alcune malattie croniche a lungo termine che si verificano nella vita adulta siano almeno in parte determinate da processi che si verificano durante la vita intrauterina (cardiopatia coronarica, ictus, ipertensione e non insulino-dipendente diabete). La placenta è stata definita "diario della vita intrauterina" ed ha il potenziale per chiarire molti aspetti di questi processi (Redline, 2008). Concentrandosi sulla medicina veterinaria, negli ultimi decenni l'esame della placenta viene eseguita negli equini, ed è considerato parte delle procedure ostetriche. Inoltre, l'influenza della vita uterina è stato dimostrata come un fattore determinante di prestazioni in gara adulti nei cavalli (Foote *et al.*, 2012). La placenta del cane viene definita zonata, "labirintine", deciduata, lobulare ed endotelio-coriale. Essa è dotata di pieghe o lamelle (Leiser e Kohler 1983; Miglino *et al.*, 2006; Aralla *et al.*, 2013; Furukawa *et al.*, 2014) che si intrecciano formando il labirinto. Questo tipo placentare è invasivo, ma il grado di invasività è relativamente poco profondo rispetto ad altri tipi placentari. Il citotrofoblasto circonda i vasi sanguigni materni e forma, con il sinciziotrofoblasto ed il mesenchima allantocoriale, il labirinto placentare (Anderson, 1969; Barrau *et al.*, 1975; Sandoval *et al.*, 2001.) che riveste una fascia equatoriale che circonda il feto (Anderson, 1969; Barrau *et al.*, 1975; Sandoval *et al.*, 2001). La struttura tridimensionale della placenta dei carnivori, e del cane in particolare, è stata compresa attraverso l'ottenimento di calchi vascolari. L'aspetto istologico a piccolo ingrandimento consente di intuire unità vagamente rettangolari orientate verticalmente con arterie (stem arteries) originanti dal versante endometriale, regolarmente e

ritmicamente poste al centro unità che vengono definite lobuli vagamente prismatici (Krebs et al., 1997; Miglino et al., 2006; Aralla et al., 2013). Un esame istologico a maggior ingrandimento rivela la struttura a lamelle di mesenchima anastomizzate, ricoperte dalle cellule del trofoblasto tra cui si identificano quelle del citotrofoblasto e quelle del sinciziotrofoblasto, le prime sono cellule a margini netti, con un unico, grande nucleo ed un abbondante citoplasma lievemente basofilo; il nucleo è vescicoloso con talvolta nucleolo tondo magenta variamente disposto. Le cellule del sinciziotrofoblasto, come suggerisce il nome, derivano dalla fusione di molte cellule e sono multinucleate, sono più eosinofile, hanno confini indistinti e hanno nuclei più piccoli e centrali (fino a dieci). I nuclei sono ovali e la cromatina è disposta a zolle. Il compartimento extracellulare è inapparente ed incospicuo, solo attraverso indagini ultrastrutturali sono state evidenziate le cellule deciduali. I capillari materni, dall'endotelio prominente, sono circondati dal trofoblasto e da numerosi capillari (Anderson, 1969; Barrau *et al.*, 1975; Sandoval *et al.*, 2001). Si riscontrano inoltre due fasce che delimitano il labirinto e vengono definite zone ematofaghe marginali, si tratta di strutture multilacunari contenenti sangue materno da stagnante ad autolitico delimitate da cellule colonnari del trofoblasto che esplicano attivamente eritrofagocitosi e si ritiene siano importanti nel trasporto placentare del ferro. Tali zone ematofaghe possono essere riscontrate anche nel labirinto (Furukawa *et al.*, 2014). I dati sul cane volti ad indagare le correlazioni clinico-patologiche tra istologia placentare ed outcome in cani femmine convenzionali sono da scarse a nulle. Poche indagini descrivono le caratteristiche anatomo-patologiche della placenta canina e sono relazione a casi sporadici di disturbi o disordini riproduttivi acuti ottenuti in contesti sperimentali (Hashimoto *et al.*, 1979; Dubey *et al.*, 2005; Steiger et al., 2006; Gyuranecz *et al.*, 2011; Foster, 2013; Srivastava *et al.*, 2013). L'obiettivo del presente studio è quello di descrivere i reperti istologici della placenta del cane in soggetti convenzionali, indagando le putative correlazioni clinico-patologiche. Dunque si porrà l'accento sugli aspetti descrittivi, per poi interpretare le manifestazioni clinico-patologiche.

Materiali e metodi

I cani (femmine convenzionali) sottoposti a taglio cesareo come intervento di elezione o sottoposti a taglio cesareo in contesto di urgenza presso il Servizio di Teriogenologia del Dipartimento di Scienza Mediche Veterinarie di Bologna, nel periodo novembre 2012-novembre 2013, sono stati inclusi nel presente studio. I proprietari sono stati informati ed hanno dato il consenso per il trattamento dei dati. Per ciascun caso erano disponibili: razza, peso, età, numero della gravidanza (dati materni), outcome dei cuccioli, campione di placenta fissato in formalina tamponata al 10% (dati cucciolo). Sono stati

considerati tre possibili outcome dei cuccioli: sano, outcome negativo (presentanti patologie o morti nelle prime 24 h o entro 7 gg), nato morto, sulla base dei parametri clinico-patologici ostetrici.

La placenta fissata in formalina è stata esaminata e processata ottenendo una sezione circonferenziale (parziale o totale) equatoriale, inclusa in paraffina e ne è stato allestito un preparato istologico (colorazione ematossilina-eosina; spessore 4µm). I preparati istologici sono stati codificati.

Morfometria ed istopatologica

Per ciascun preparato sono state acquisite 5 fotografie di campi non adiacenti casuali del labirinto placentare (2088x1550 pixel, obj=40x, gif, 7,35 pixel/micron) con un microscopio Leica DMLB ed una fotocamera Leica Dfc320 (Leica, Wetzlar, Germany). Le procedure di analisi di immagine sono state effettuate con Imagej (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Una griglia a maglie quadrate di 22 micron (lato) è stata sovrainposta sulle immagini, i capillari giacenti sugli incroci delle maglie sono stati contati (totale 108 incroci). I capillari sono stati contati con il plugin cell-counter di Imagej. Per ciascun preparato istologico, è stato ottenuto un valore medio di numero di densità capillare.

I preparati istologici codificati sono stati osservati, i seguenti parametri sono stati considerati e descritti: presenza di cellule infiammatorie, presenza di degenerazione/necrosi ed autolisi. Tali variabili sono state considerate variabili dicotomiche (0=assenza; 1= presenza). I livelli di estensione delle lesioni sono stati definiti: lobulare o focale, multilobulare (multifocale o multifocale confluyente) o diffuso. Le altre lesioni riscontrate sono state descritte dal punto di vista istopatologico qualitativo.

Analisi statistica

La distribuzione delle variabili è stata stimata con il test di Shapiro-Wilk, i confronti multipli di dati distribuiti normalmente sono stati effettuati con ANOVA ad una via e post-hoc; i confronti multipli di dati con distribuzione non normale sono stati effettuati con Test non parametrico di Kruskal-Wallis e poi confronto a coppie. Le variabili dicotomiche sono state esaminate con test Chi-quadrato. La significatività statistica è stata posta per $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata condotta con SPSS.

Risultati

Un totale di 35 placente appartenenti ad otto figliate sono stati studiati (tabella 1). Per ciascuna classe di outcome, sono state esaminate 23 placente ottenute da cuccioli sani, 7 placente di cuccioli con outcome negativo ed infine 6 placente ottenute da natimorti.

ID	Razza	Peso (kg)	Età (anni)	No gravidanza	Numero cuccioli	Cuccioli sani	Cuccioli con outcome negativo	Nati morti	Placente esaminate
1	Shetland Sheepdog	6,5	4	1	3	2	1	0	3
2	Boxer	35,8	-	-	11	8	3	0	11
3	Cane montagna dei pirenei	46	5	2	5	1	2	2	5
4	Pastore Maremmano	-	7	1	5	5	0	0	5
5	Chihuahua	1,8	4	1	1	0	1	0	1
6	Boston Terrier	8,3	1	1	3	3	0	0	3
7	Meticcio	4,2	3	1	2	2	0	0	1
8	Labrador	51	7	2	12	2	-	4	6

Tabella 1: sinossi delle caratteristiche di segnalamento dei soggetti selezionati per lo studio.

Le placente non hanno mostrato alterazioni macroscopiche durante la procedura di trimming.

Istopatologia

Una placenta (cucciolo 5 id 3), ottenuta da un cucciolo natomorto, mostrava gravi e diffusi fenomeni autolitici, e non è stata inclusa nella casistica. Istologicamente, le placente mostravano uno sviluppo coerente con l'età gestazionale ed una maturità adeguata. La lesione più di frequente riscontrata è stata la lesione degenerativo-necrotica con distribuzione lobulare (focale) o multilobulare (multifocale o

multifocale confluyente). I soggetti appartenenti alla categoria sani mostravano lesioni degenerativo-necrotiche in 12 casi su 23 placentate esaminate, lesioni degenerativo necrotico, in 9 casi erano focali o lobulari, in 3 casi multilobulari. I soggetti con outcome negativo mostravano in 5 casi su 7 lesioni degenerativo-necrotico placentari, di cui tre erano lobulari e 2 multilobulari. Infine i soggetti nati-morti mostravano sempre lesioni degenerativo-necrotico, in un caso a distribuzione lobulare, in 4 a distribuzione multilobulare. Il confronto delle proporzioni dei soggetti con lesioni necrotico-degenerative multilobulari tra i tre gruppi ha rivelato una differenza statisticamente significativa (Chi quadrato di Pearson=9,67; p=0,008). Talvolta le lesioni necrotico degenerative erano accompagnate da presenza di cellule infiammatorie intravascolari, nei capillari materni, costituito da linfociti e taluni neutrofili. I leucociti erano presenti in 4 soggetti con outcome positivo, in un soggetto con outcome negativo ed in due soggetti natimorti. Non si sono riscontrati infiltrati infiammatori in assenza di lesioni necrotico degenerative. Sono stati inoltre riscontrati focolai di calcificazione microfocale in 8 soggetti con outcome positivo, in 3 soggetti con outcome negativo ed in tre soggetti natimorti. Tra i reperti istologici addizionali si sono riscontrati: trombosi delle arterie materne in un soggetto con outcome negativo e due soggetti natimorti (Figura 6), e focolai lineari singoli o multipli di calcificazioni a carico del mesenchima trofoblastico o del labirinto, in un soggetto sano, in due soggetti con outcome negativo ed un soggetto nato morto. Sono stati inoltre riscontrati focolai affini all'ematoma marginale in 2 soggetti sani, 2 soggetti con outcome negativo ed un soggetto nato morto.

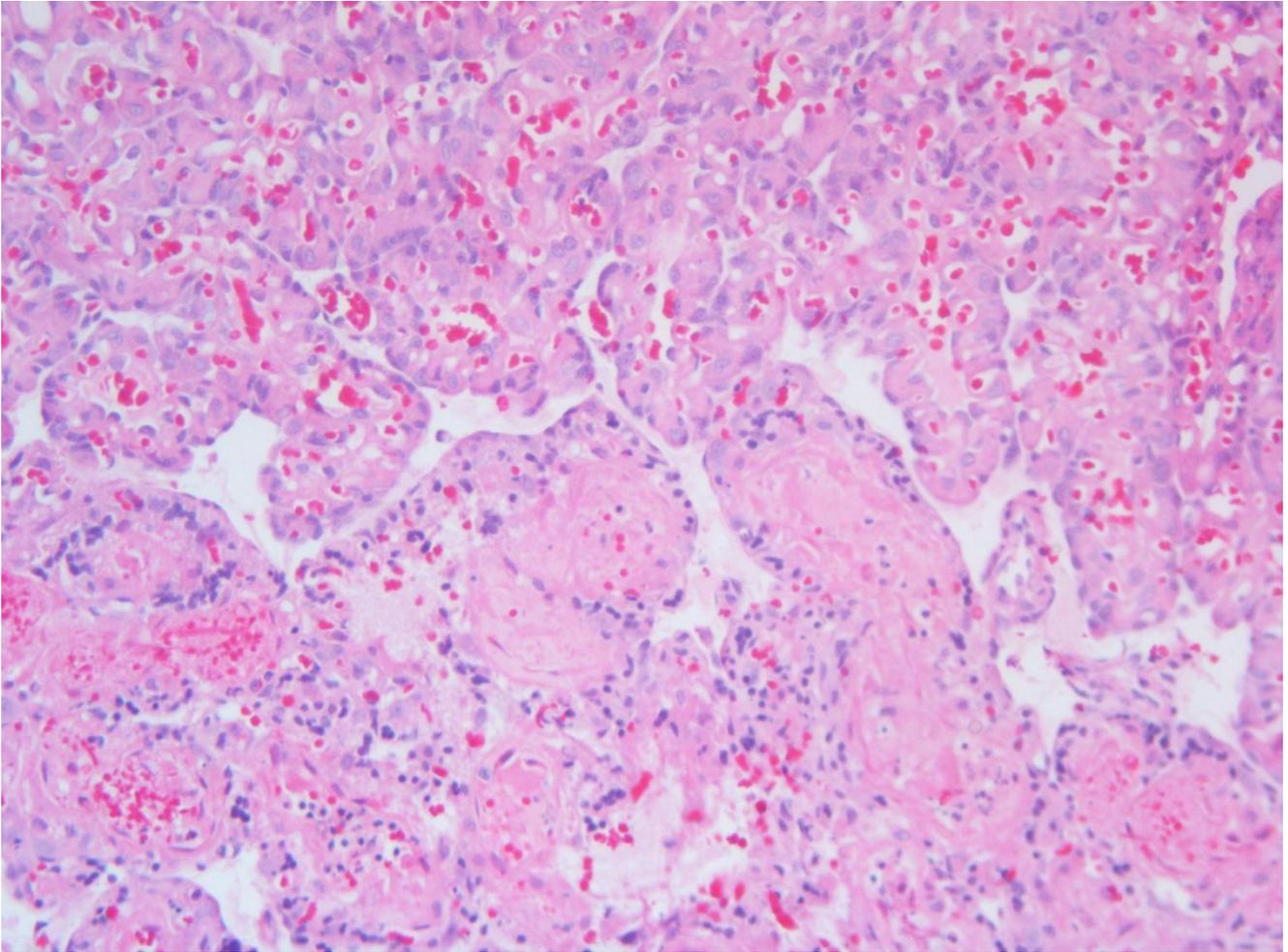


Figura 1: Placenta cucciolo 3, sano, Id soggetto 1: Infarto lobulare: lobulo nei miti della norma (in alto) e lobulo coinvolto da necrosi coagulativa (infarto) (basso) (Obj 20x).

Istologicamente i lobuli coinvolti da necrosi coagulativa (infarto) (Figura 1), sono caratterizzati da una lesione ben demarcata, l'outline delle lamelle trofoblastiche è mantenuto, le cellule del sinciziotrofoblasto mostrano condensazione della cromatina (picnosi) e frammentazione della cromatina (carioressi), il dettaglio cellulare è perso (necrosi coagulativa); le cellule del citotrofoblasto mostrano variabili gradi di degenerazione o anche esse mostrano necrosi coagulativa. Si apprezzano inoltre sparsi eritrociti stravasati (emorragia). I capillari materni sono espansi da una rete di materiale fibrillare eosinofilo (fibrina) contenete eritrociti e scarso detrito corioretico. L'endotelio dei capillari materni non è visibile.

Taluni lobuli mostrano un infiltrato infiammatorio a livello di vasi materni e le cellule del sincizio trofoblasto mostrano rari quadri multifocali di coartazione del nucleo (picnosi) ed una vacuolizzazione citoplasmatica moderata (Figura 2). Le cellule del citotrofoblasto sono invece caratterizzate da un aumento delle vacuolizzazioni citoplasmatiche. I capillari materni contengono linfociti, monociti e neutrofilo, con tralci di fibrina. Lo spazio subendoteliale è moderatamente espanso da aree chiare (edema). Le cellule del trofoblasto talvolta sono caratterizzate, oltre che da una prominente vacuolizzazione citoplasmatica, anche da materiale globulare vitreo eosinofilo citoplasmatico (degenerazione).

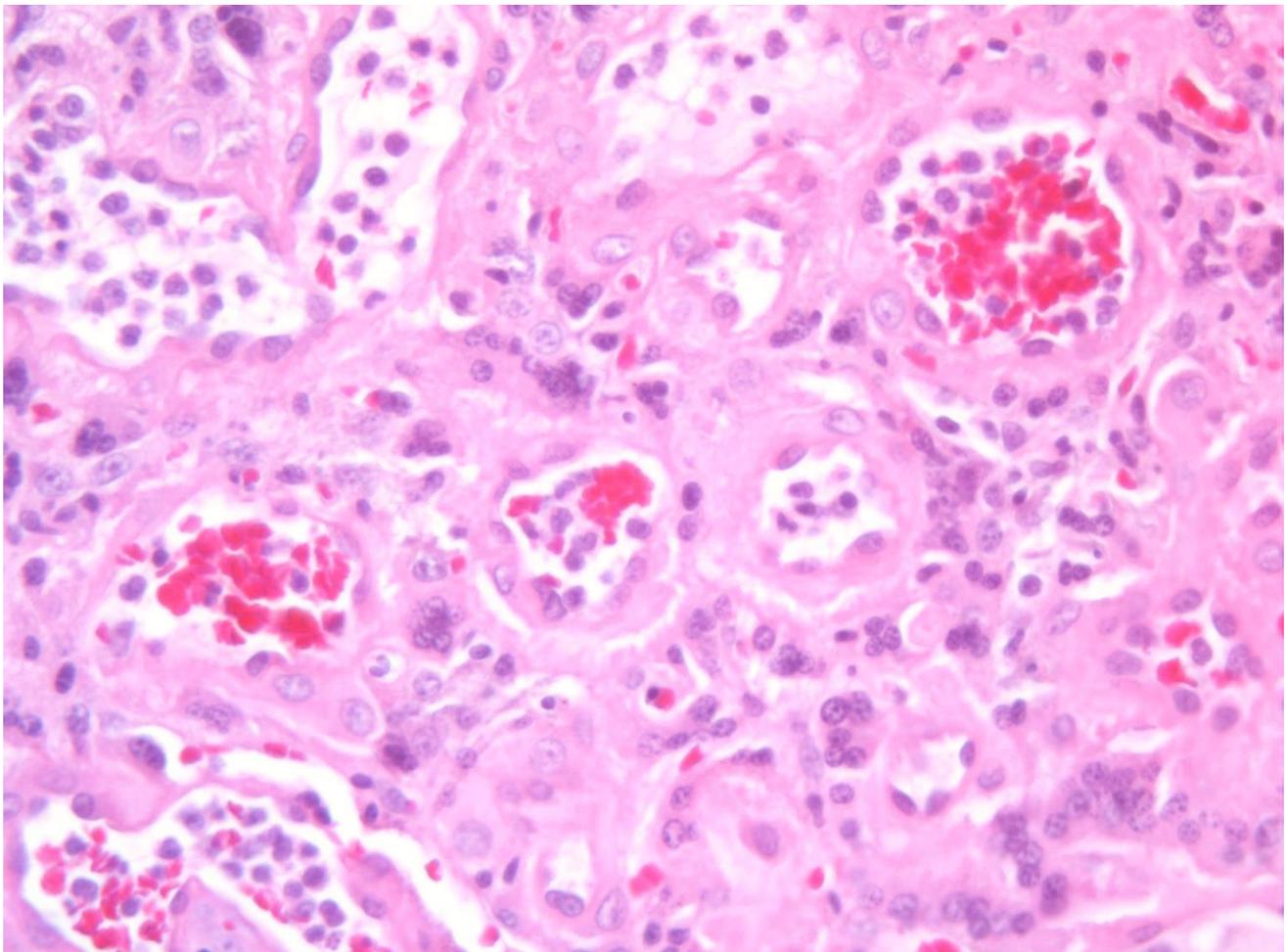


Figura 2: placenta cucciolo 1, nato morto, Id soggetto 3: prominente presenza di linfociti, neutrofilo e fibrina nei capillari materni a livello di labirinto; si evidenziano inoltre quadri di picnosi e cariolisi multifocali del sinciziotrofoblasto (Obj 40x).

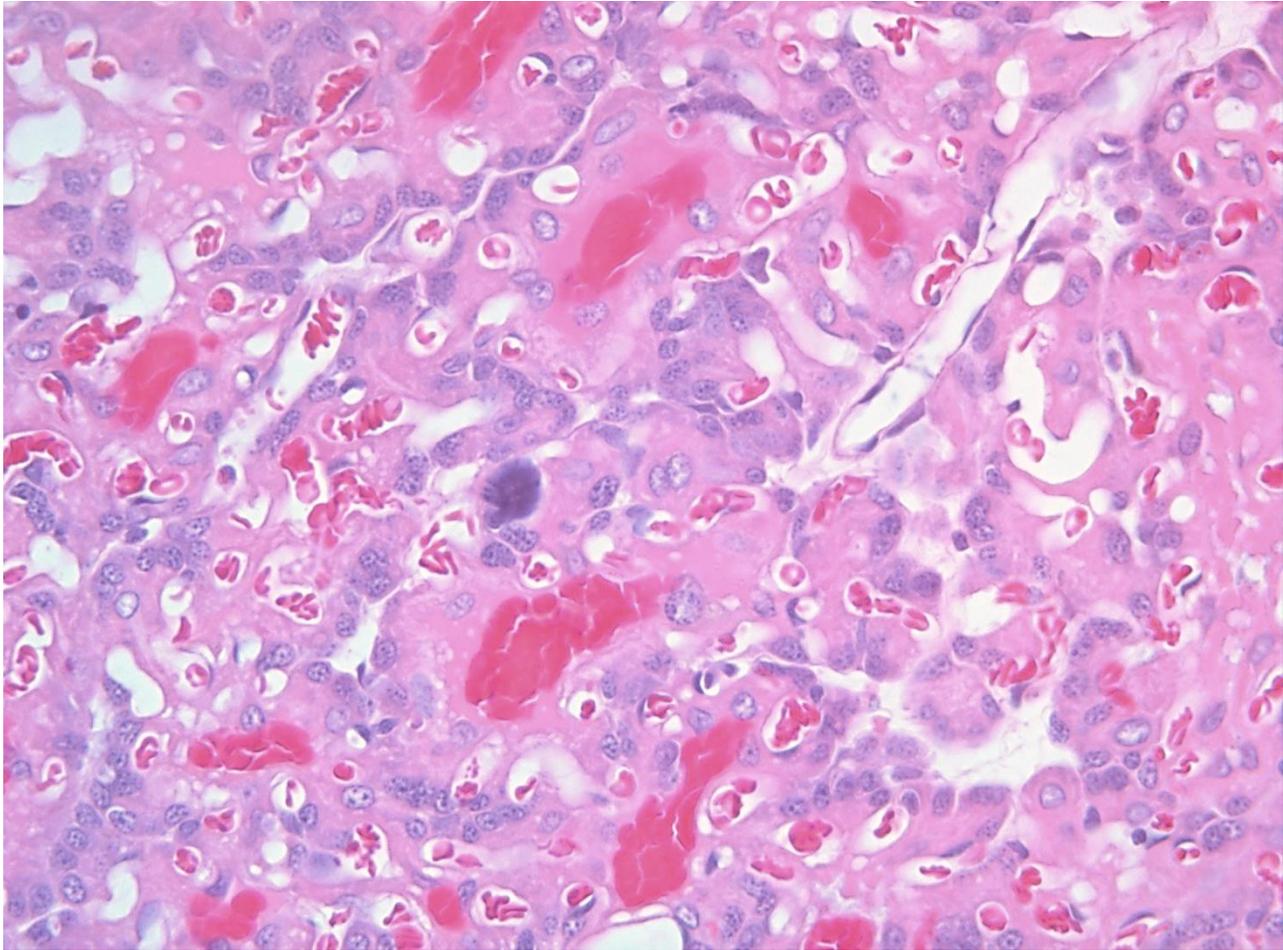


Figura 3: placenta cucciolo 1-soggetto 6: esempio di calcificazione microfocale, la placenta risulta nei limiti della norma a parte il microfocolaio di calcificazione (Ob 40x)

La calcificazione microfocale (primo pattern) si mostra con la presenza di rari foci di materiale granulare basofilo dalla forma vagamente stellata (Figura 3). Tali lesioni si riscontrano a livello di lamelle trofoblastiche, e sono circondate da cellule del sinciziotrofoblasto e del citotrofoblasto nei limiti della norma. Le calcificazioni lineari (secondo pattern) sono vaste (1x3 mm), si irradiano dal versante fetale e sono circondate da cellule del citotrofoblasto degenerate o disposte a palizzata, con presenza di moderata quantità di detrito amorfo eosinofilo e carrirettico (necrosi colliquativa) (Figura 4). Un terzo pattern di calcificazione riscontrato è rappresentato da sparso materiale granulare frammentato basofilo (mineralizzazione) immerso in matrice extracellulare di tipo collagene maturo, contenente rari elementi fusiformi stellati (fibroblasti). Lo stroma è delineato da cellule del citotrofoblasto (Figura 5). Tali lesioni sono adiacenti a foci di biomineralizzazione lineare.

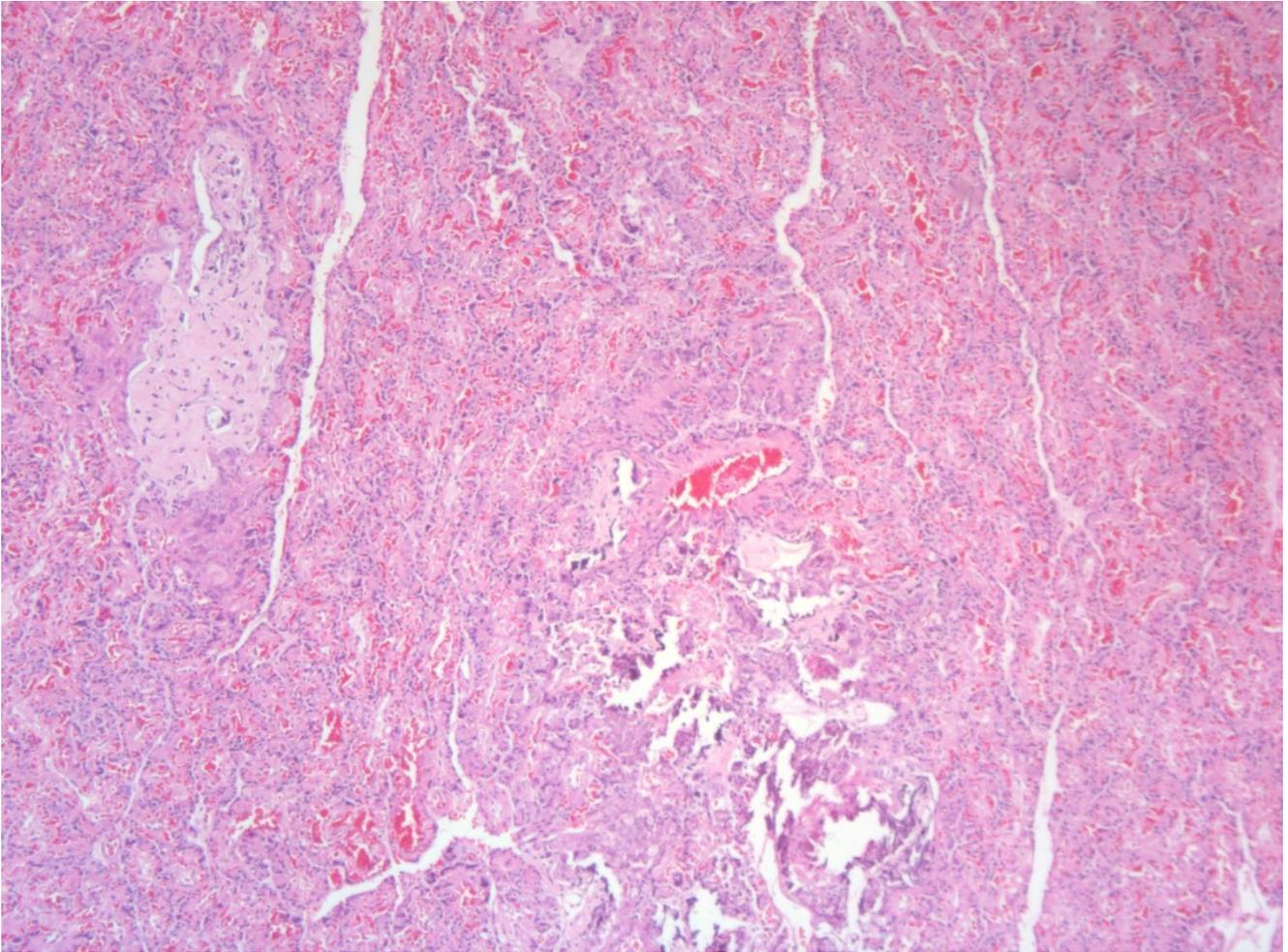


Figura 4: cucciolo 4-id soggetto 3: esempio di ampi focolai di mineralizzazione lineare multifocale delimitati da cellule del trofoblasto con detriti carioretici, focolaio adiacente di mineralizzazione e fibrosi dello stroma trofoblastico (Ob 5x)

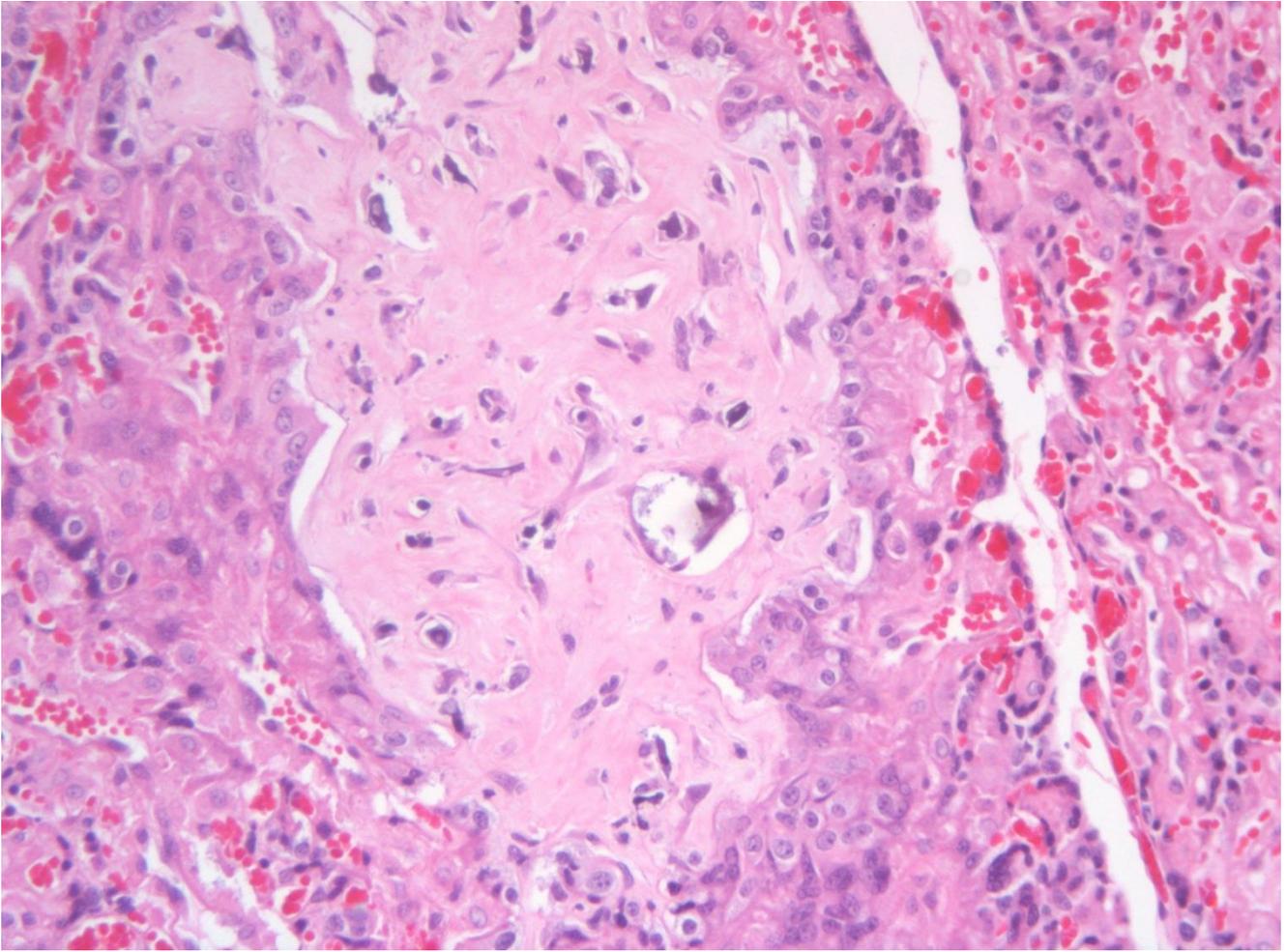


Figura 5 cucciolo 4-id soggetto 3: particolare di fig 4: esempio di mineralizzazione dello stroma trofoblastico.

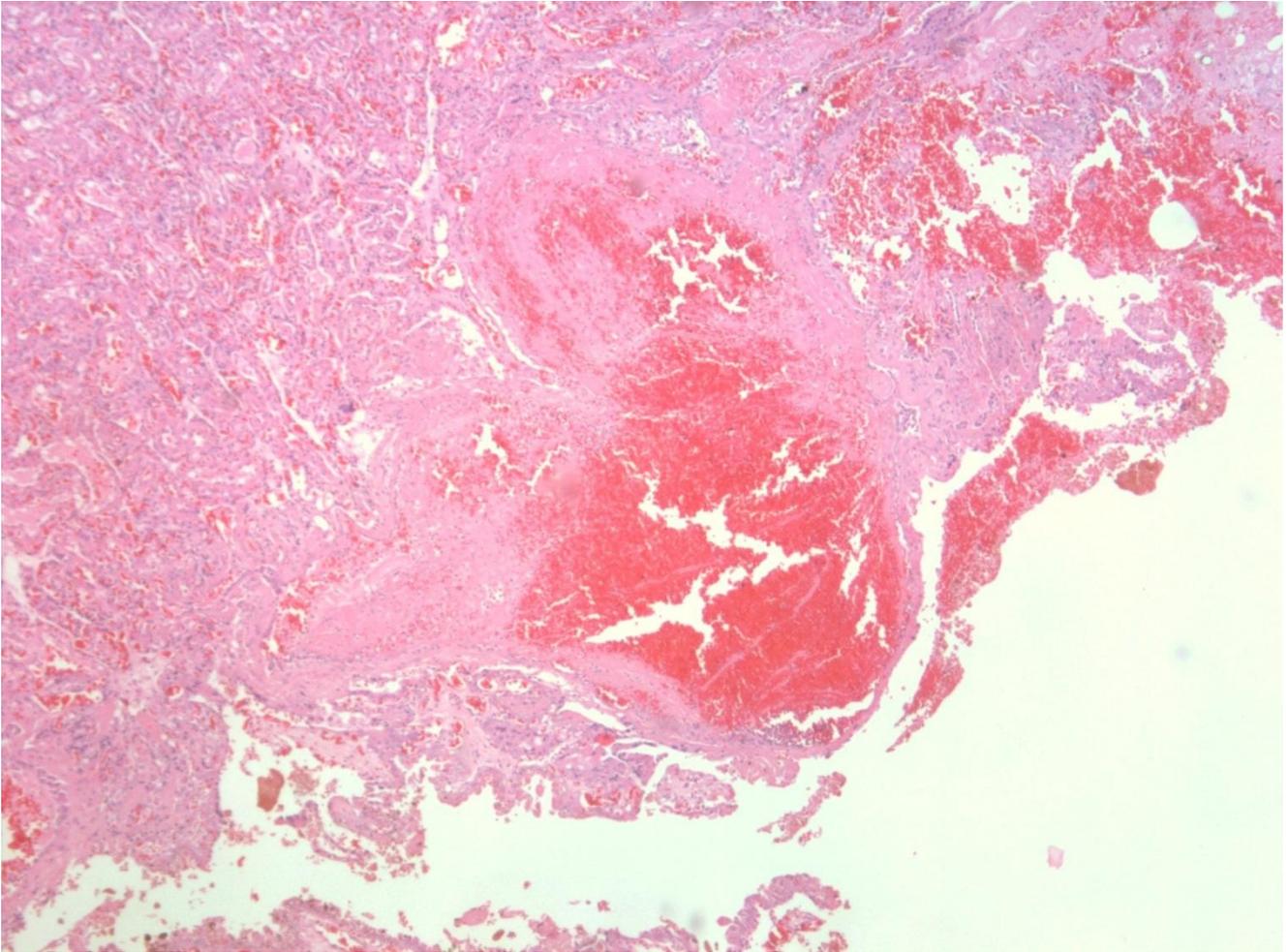


Figura 6: Cucciolo 6, natomorto, id soggetto 8: Trombosi delle arterie materne con vasta area di infarto emorragico placentare.

Il confronto della densità capillare dei cuccioli appartenenti al gruppo H (sani), S (outcome negativo) e nati morti non ha rivelato differenze (ANOVA ad una via, $p=0,82980$). Le placentate ottenute da cucciolate poco numerose avevano una densità microvascolare di $11,89 \pm 3,67$ ($n=11$), mentre quelle ottenute da cucciolate numerose (id=2;9d=8) avevano una densità di $16,36 \pm 2,86$ ($n=23$), la differenza era significativa (Student t test ; $p=0,000484$) (grafico 1).

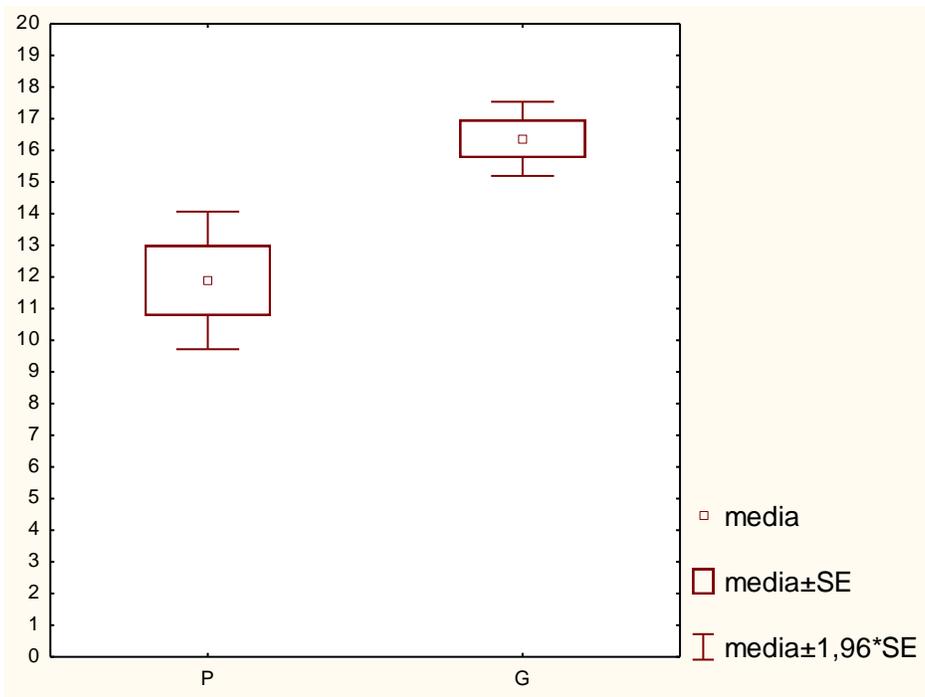


Grafico 1: box and whiskers plot densità dei capillary a livello di labirinto placentare nei gruppi con cucciolate inferiori o uguali a 5 (P) e superiori a 5(G).

Discussione

In medicina vengono suggeriti quattro motivi per cui la patologia placentare è clinicamente utile: in primis per rilevare lesioni che possono avere implicazioni immediate sulla madre o sul neonato, per rilevare alterazioni che possono avere valore predittivo sulle future gravidanze; per spiegare eventuali outcome negativi o infausti della gravidanza ed infine per dirimere questioni medico-legali in caso di mortalità neonatale. (Redline, 2014). Inoltre la placenta è l'unico esempio in patologia di campione che fornisce informazioni su due pazienti (madre e conceptus) (Lewis e Benirschke, 2007). Anche in medicina veterinaria si può sostenere che l'esame istopatologico placentare può offrire dati clinicamente utili simili a quanto descritto, inoltre le argomentazioni valide in medicina sono importanti anche in campo veterinario. Nel presente studio vengono descritte ed interpretate le lesioni istologiche ipotizzando anche quali tra esse possano avere causato conseguenze sull'outcome, e quali vadano considerate lesioni background o incidentali.

La placenta cresce rapidamente, e mostra importanti modifiche e cambiamenti nella struttura morfologica in base allo sviluppo del feto. Anche se la placenta è un organo provvisorio, è l'interfaccia tra madre e conceptus, è un organo poliedrico che svolge una serie di funzioni importanti durante la

gestazione. Queste funzioni includono l'ancoraggio alla parete uterina, lo sviluppo del feto, la tolleranza immunitaria materna, scambio O₂ / CO₂, fornendo nutrienti per il feto e la rimozione dei prodotti di scarto. Inoltre protegge l'embrione / feto come una barriera contro xenobiotici e rilascia una serie di steroidi, ormoni e citochine (Migliano *et al.*, 2006; Aralla *et al.*, 2013; Furukawa *et al.*, 2014).

L'istoarchitettura funzionale lobulare, descritta nell'introduzione, è importante per descrivere ed interpretare i pattern lesionali che si possono identificare a livello placentare nel cane. Infatti nel presente studio è stata usata la descrizione di distribuzione lobulare o multilobulare per indicare il coinvolgimento di lobuli singoli o multipli da lesioni infartuali. Un'altra lesione di difficile interpretazione, caratterizzata da un pattern lineare, è stata la mineralizzazione del mesenchima trofoblastico.

La lesione patologica di più frequente riscontro, caratterizzata da estensione variabile, è stato l'evento infartuale, ciò ricorda molto, adottando un punto di vista di patologia comparata, le lesioni di frequente riscontro in medicina umana (Baergen, 2011). Tali lesioni hanno mostrato timing iperacuto (con carioressi moderata delle cellule del sinciziotrofoblasto) o stadi subacuti, con necrosi coagulativa diffusa, a carico di entrambi i tipi cellulari del trofoblasto. Tale evidenza putativamente fa ipotizzare che le cellule del citotrofoblasto siano più resistenti all'ipossia/anossia, anche alla luce del fatto che delineano le lacune di sangue da stagnante ad autolitico dei cosiddetti ematomi marginali della placenta canina, e sono ritenute essere cellule con caratteristiche istiocitarie. La medesima evidenza è stata riscontrata da Steiger e colleghi, i cui risultati sperimentali sono discussi più avanti (2006).

L'infarto placentare, se lobulare, è con elevata probabilità privo di conseguenze per la grande efficienza di scambio del parenchima placentare residuo. Nei soggetti nati morti e nei soggetti con outcome infausto la frequenza di lesioni infartuali multilobulare era significativamente più alta. Di conseguenza in tali condizioni l'estensione della lesione può avere influito sull'outcome. L'estensione della lesione dovrebbe essere sempre considerata e caratterizzata, alla luce del fatto che le indagini comparative sulla placenta hanno affermato che l'efficienza di scambio della placenta del cane è a metà tra le classi epitheliocoriale e endotelio-coriale di placenta. Come conseguenza anche se un'alta percentuale di superficie di scambio può essere non funzionale, la rimanente parte è in grado di svolgere una funzione di compensazione (Prakash Telugu e Green, 2008). Dunque il riscontro di infarti a distribuzione lobulare andrebbe considerato un reperto background, se invece si evidenziano infarti multilobulari con lesioni di tipo trombotico a carico di arterie materne, si può avanzare il sospetto che ci si trovi di fronte ad una condizione di insufficienza placentare acuta con risvolti sull'outcome fetale.

La necrosi placentare coagulativa multifocale con diversi tipi e gravità di placentite è stata correlata nel cane ad agenti infettivi: *Brucella* spp, *Leptospira* Spp., *Streptococcus canis*, *Canine Herpesvirus*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* Spp (Hashimoto et al., 1979; Dubey *et al.*, 2005; Gyuranecz *et al.*, 2011; Foster, 2013; Srivastava *et al.*, 2013), ma le descrizioni istopatologiche sono brevi, spesso vengono solo riportate le diagnosi morfologiche. Sono stati effettuati studi sperimentali che hanno usato il cane come animale modello per la preeclampsia della donna, ed in tali contesti sono stati evidenziate lesioni infartuali emorragiche placentari molto vaste, che sono state imputate ad ischemia prolungata, poiché era stata indotta una stenosi aortica nei cani. In tale studio vengono descritti foci infartuali emorragici confluenti, con evidenza di picnosi e perdita del dettaglio di ampie zone di cordoni trofoblastici (Abitbol *et al.*, 1976). Un ulteriore studio ha voluto indagare le variazioni istologiche ed ultrastrutturali subite dalla placenta di cane a seguito di interruzione farmacologica della gravidanza; a differenza del presente studio, le placente esaminate erano meno mature (circa 30 gg di gravidanza). Le lesioni riscontrate a livello placentare sono state definite infarti, ma privi di evidenza di lesioni trombotiche, inoltre è stato rilevato come la componente sinciziotrofoblastica fosse precocemente coinvolta da lesioni degenerative necrotiche, con una risposta reattivo-proliferativa del citotrofoblasto (Steiger et al., 2006). Come già detto, i pochi studi sono rappresentati da report su focolai di aborto/disordini riproduttivi acuti (patologie spontanee), oppure patologie indotte; il presente studio ha voluto caratterizzare le lesioni in soggetti convenzionali.

L'aumento del numero dei leucociti intravascolari non sembra essere una lesione primaria, ma molto probabilmente è evocato dai cambiamenti degenerativi o necrotici. Di conseguenza le lesioni descritte potrebbero essere definiti infarti placentari acuti o subacuti lobulari o multilobulari.

Una lesione elementare che è stata riscontrata con due diversi pattern è stata la calcificazione: il primo pattern può essere definito microfocale fisiologico, si manifesta a livello di placenta in varie specie, ed è interpretato come un reperto occasionale. La mineralizzazione si verifica perché il sangue fetale è relativamente più acido del sangue materno (Haschek *et al.*, 2010). Si vuole sottolineare che tale riscontro non è mai stato associato ad eventi degenerativo necrotici e/o infiammatori.

Il secondo pattern di mineralizzazione, lineare, è sempre stato accompagnato da degenerazione/necrosi ed è sempre stato riscontrato nei soggetti con outcome negativo o nati morti. Tale secondo pattern di calcificazione è coerente con una mineralizzazione distrofica post necrotica. La presenza di multipli focolai di calcificazione nel contesto dello stroma trofoblastico è invece di difficile interpretazione, poiché si mostra come singoli focolai, non associato a necrosi e dunque può putativamente essere una fase di sofferenza ipossica locale dello stroma trofoblastico, e non si può

escludere che possa essere una fase tardiva di evoluzione fibrotica di una più vasta calcificazione lineare, poc'anzi descritta, anche perché compresente ed adiacente a focolai multipli di vasta mineralizzazione lineare. La forma e l'orientamento di tali lesioni, lineari ed irradiantesi dal versante fetale, fa ipotizzare anche in questo caso l'evidenziazione di una struttura anatomica ad opera di un processo patologico.

Il riscontro talvolta di focolai coerenti con zone ematofaghe a carico del labirinto sono da considerarsi reperti accidentali privi di rilevanza patologica, poiché viene spesso riscontrato (Furukawa *et al*, 2014).

I capillari svolgono un ruolo cruciale nel trasporto di ossigeno e nutrienti e nel presente studio la perfusione è stata stimata in termini di densità per campo microscopico ed è stato dimostrato come non vi siano differenze quantitative di densità microvascolare dei cuccioli con i tre outcome, ma invece siano presenti lesioni infartuali con diversa estensione che pregiudicano lo scambio globale placentare. Adottando un punto di vista comparativo, la densità microvascolare placentare, viene modulata nelle specie politociche di interesse veterinario (suino ed ovina) è noto come la densità capillare è maggiore nelle razze a più alta prolificità con placentate di minori dimensioni ed incrementato rapporto fetoplacentare (Fowden *et al.*, 2009). Alla luce di tali evidenze, nel presente studio si è identificato il medesimo adattamento di incremento di densità capillare nelle placentate ottenute da cucciolate numerose. La neoangiogenesi o vasculogenesi adattativa che è stata quantificata mediante metodo istologico e point counting, come numero di capillari a livello di lobuli labirintini (area di scambio) conferma come la placenta sia un organo plastico ed adattabile a modificate esigenze. La resa dello scambio è putativamente superiore per unità di area nelle placentate ottenute da cucciolate numerose, in base all'evidenza istologica. In medicina la diminuzione di capillari a livello di villi è stata riscontrata nelle gravidanze contratte in età avanzata, nella preeclamsia e nel diabete. Il tabagismo attivo o passivo e l'anemia materna è stato invece correlato ad un incremento dei capillari (risposta adattativa ad ipossia preplacentare) (Zigić *et al.*, 2010; Rath *et al.*, 2011; Sankar *et al.*, 2013). Nella casistica selezionata, avevamo soggetti (madri) giovani, di $4,4 \pm 2,1$ anni, con quadro clinico nei limiti della norma, dunque la densità microvascolare placentare non dovrebbe essere stata influenzata da fattori putativamente confondenti, sebbene non sia dimostrato nella specie canina alcun nesso clinico-patologico tra madre e placenta.

La densità microvascolare non ha avuto influenza sull'outcome del cucciolo, ma in questa sede viene suggerito che anche nella specie canina la numerosità della cucciolata modula la densità

microvascolare placentare. Inoltre tale densità dipende dalla dimensione della cucciolata e dunque andrebbe valutata alla luce di questo parametro.

Un primo risultato del presente lavoro è la descrizione dei reperti istologici caratteristici della placenta a termine di cani convenzionali. Inoltre è stato possibile caratterizzare le lesioni di frequente riscontro: gli infarti lobulari, che se mostrano distribuzione multilobulare sono molto suggestivi di un outcome infausto per il cucciolo. Si propone la definizione di distribuzione lobulare, poiché il lobulo rappresenta l'unità elementare istoarchitettonica e funzionale della placenta del cane. La presenza di lesioni trombotiche multifocali a carico delle arterie materne rappresenta un reperto delle gravidanze con prognosi infausta. Inoltre le lesioni di mineralizzazione microfocale vanno considerate lesioni background, mentre quelle con pattern lineare, vaste, in un contesto necrotico-degenerativo a carico del labirinto, sono state riscontrate nei casi di outcome negativo o natimortalità. Infine è stato rilevato un adattamento di incrementata densità capillare nelle placente ottenute da nidiate numerose.

Bibliografia

Abd-Elnaeim MM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR. (2006) Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta*; 27(11-12):1103-13.

Abitbol MM, Pirani CL, Ober WB, Driscoll SG, Cohen MW. (1976) Production of experimental toxemia in the pregnant dog. *Obstet Gynecol.*;48(5): 537-48.

Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale PD. (2002) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*; 123: 445–53.

Amoroso EC. (1952) Placentation. In: Parkes AS, editor. *Marshall's physiology of reproduction*. 3rd ed. London: Longman Green; 127–297.

Anderson JW. (1969) Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog. I. The placental labyrinth. *Anat Rec.*; 165(1):15-35.

Aralla M, Groppetti D, Caldarini L, Cremonesi F, Arrighi S. (2013) Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. *Res Vet Sci.*; 95(1):15-22

Arora SK, Dey P. (2011) Fractal and lacunar dimension of the chorionic villi of molar pregnancy. *Anal Quant Cytol Histol.*; 33:82–4.

Baergen RN. (2005) Chapter 18 “Placental Malperfusion” In *Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta* Springer Science+Business Media, Inc.

Barone R. (2003): “Feto e i suoi annessi”, in “Anatomia comparata degli animali domestici”, Vol.4 “Splanchnologia, apparecchio urogenitale, feto e suoi annessi, peritoneo e topografia addominale”, Edagricole, Bologna, 2003

Barrau MD, Abel JH, Torbit CA, Tietz WJ. (1975) Development of the implantation chamber in the pregnant bitch. *Am J Anat.*; 143(1):115-30.

Bertram JF, Rogers AW. (1981) The development of squamous cell metaplasia in human bronchial epithelium by light microscopic morphometry. *J Microsc.*;123: 61–73.

Castagnetti C, Pirrone A, Mariella J, Mari G. (2010) Venous blood lactate evaluation in equine neonatal intensive care. *Theriogenology*; 73: 343–57.

Collins MH. (1993) Placentas and foetal health. *Equine Vet J Suppl*;14: 8–11.

- Cottrill CM, Jeffers-Lo J, Ousey JC, McGladdery AJ, Ricketts SW, Silver M (1991) The placenta as a determinant of fetal well-being in normal and abnormal equine pregnancies. *J Reprod Fertil Suppl*; 44:591–601.
- Dubey JP, Rosypal AC, Pierce V, Scheinberg SN, Lindsay DS. (2005) Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*; 227 (8):1266-9.
- Ducray JF, Naicker T, Moodley J. (2011) Pilot study of comparative placental morphometry in pre-eclamptic and normotensive pregnancies suggests possible maladaptations of the fetal component of the placenta. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 156: 29–34.
- Eke A, Herman P, Kocsis L, Kozak LR. (2002) Fractal characterization of complexity in temporal physiological signals. *Physiol Meas*; 23: 38.
- Foote AK, Ricketts SW, Whitwell KE. (2012) A racing start in life? The hurdles of equine fetoplacental pathology. *Equine Vet J Suppl.*; (41):120-9.
- Foster A. (2013) Chapter 18: female reproductive system and mammary gland *Pathologic Basis of Veterinary Disease* Di James F. Zachary, M. Donald McGavin.
- Fowden AL, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, Constancia M, Burton GJ. (2009) Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *J Physiol* 15; 587(Pt 14): 3459-72.
- Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. (2014) A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol.*; 27(1): 11-8.
- Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. (1999) Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. *J Reprod Fertil*; 117:143–52.
- Grosser O. (1927) Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere. J.F. Bergmann, München, 1927.
- Gyurancz M, Szeredi L, Rónai Z, Dénes B, Dencso L, Dán Á, Pálmai N, Hauser Z, Lami E, Makrai L, Erdélyi K, Jánosi S. (2011) Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. *J Vet Diagn Invest.*;23(1):143-7.
- Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA (2010) Chapter 19: Female Reproductive System. *Fundamentals of toxicologic pathology*. 2ND Ed., Academic Press.
- Hashimoto A, Hirai K, Okada K, Fujimoto Y. (1979) Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *Am J Vet Res.*; 40(9): 1236-40.
- Kaufmann P (1983) Vergleichend-anatomische und funktionelle Aspekte des Placenta-Baues, *Funkt. Biol. Med.* 2: 71-79,.
- Knottenbelt DC, Holdstock N, Madigan JE. (2004) *Equine neonatology medicine and surgery*. Philadelphia, PA: Saunders; 2004. 155–363.

- Krebs C, Winther H, Dantzer V, Leiser R. (1997) Vascular interrelationships of near-term mink placenta: light microscopy combined with scanning electron microscopy of corrosion casts *Microsc Res Tech.*; 38(1-2): 125-36.
- Leiser I, Kohler T. (1983) The blood vessels of the cat girdle placenta. Observations on corrosion casts, scanning electron microscopical and histological studies. I. Maternal vasculature. *Anat Embryol (Berl.)*;167(1):85-93.
- Leiser R, Pfarrer C, Abd-Elnaeim M, Dantzer V. (1998) Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. *Placenta*;19:21–39.
- Lewis SH, Benirschke K. (2007) CHAPTER 43 Placenta. in *Histology for pathologist 3rd edition* by Stacey E. Mills (Editor).
- Losa GA. (2009) The fractal geometry of life. *Riv Biol*; 102: 29–60.
- Macdonald AA, Chavatte P, Fowden AL. (2000) Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. *Placenta* ;21: 565–74.
- Mandelbrot BB. (1982) *The Fractal Geometry of Nature*. W. H. Freeman, 1982.
- Miglino MA, Ambrósio CE, dos Santos Martins D, Wenceslau CV, Pfarrer C, Leiser R. (2006) The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology.*;66(6-7):1699-702.
- Morresey PR. (2004) How to perform a field assessment of the equine placenta. In: *Proceedings of the 50th Convention of the American Association of Equine Practitioners 2004*; 50: 409–14.
- Prakash Telugu B, Green JA (2008) *Comparative Placentation*. In *Comparative Reproductive Biology* (eds H. Schatten and G. M. Constantinescu), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Rath G, Dhuria R, Salhan S, Jain AK. (2011) Morphology and morphometric analysis of stromal capillaries in full term human placental villi of smoking mothers: an electron microscopic study. *Clin Ter.*; 162(4): 301-5.
- Ray JE. (2010) *Matador and the Regulation of cyclin E1 in Normal Human Placental Development and Placental Pathology*. PhD Thesis Graduate Department of Physiology, University of Toronto
- Redline RW. (2014) Placental pathology: Is it time to get serious?
<http://contemporaryobgyn.modernmedicine.com/>
- Redline RW. Placental pathology: a systematic approach with clinical correlations. *Placenta* 2008; 29: S86–s91.

- Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. (2002) Placental development in normal and compromised pregnancies: a review. *Placenta*; 23(Suppl A):S119–29.
- Rossdale PD. (2004) The maladjusted foal: influence of intrauterine growth retardation and birth trauma. In: *Proceedings of the 50th Convention of the American Association of Equine Practitioners 2004*;50. p. 75–126.
- Samuel AC, Allen WR, Steven DH. (1974) Studies on the equine placenta I. Development of the microcotyledons. *J Reprod Fertil*; 41: 441–5.
- Samuel CA, Allen WR, Steven DH. (1975) Ultrastructural development of the equine placenta. *J Reprod Fertil*;(Suppl 23):575–8.
- Samuel CA, Allen WR, Steven DH. (1977) Studies on the equine placenta. III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. *J Reprod Fertil*; 51: 433–7.
- Sandoval C, Fisher PJ, Schlafer DH. (2001) Characterization of trophoblast cell populations by lectin histochemistry in canine placenta during development. *J Reprod Fertil Suppl*; 57:199-206.
- Sankar KD, Bhanu PS, Ramalingam K, Kiran S, Ramakrishna BA. (2013) Histomorphological and morphometrical changes of placental terminal villi of normotensive and preeclamptic mothers. *Anat Cell Biol*.;46(4):285-90.
- Srivastava R, Sanyal S, Das S. (2013) Histological changes in canine placenta during acute brucellosis. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2(8): 139-143.
- Steiger K, Politt E, Hoefmann T, Meyer-Lindenberg A, Schoon HA, Günzel-Apel AR. (2006) Morphology of canine placental sites after induced embryonic or fetal death. *Theriogenology*.; 66 (6-7): 1709-14.
- Steven DH. (1982) Placentation in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*;31: 41–55.
- Tambasco M, Eliasziw M, Magliocco AM. (2010) Morphologic complexity of epithelial architecture for predicting invasive breast cancer survival. *J Transl Med*; 8:140–51.
- Urso-Baiarda F, Grobbelaar AO. (2006) Practical nerve morphometry. *J Neurosci Meth*; 156: 333–41.
- Vaala WE, House JK, Madigan JE. (2002) Initial management and physical examination of the neonate. In: Smith BP, editor. *Large animal internal medicine*. St. Louis: Mosby;. 277–93.
- Veggetti A. (1982): “Gli Annessi Embrionali” in “Corso di embriologia”, seconda edizione, Società editrice esculapio, Bologna. 61-101.
- Veronesi MC, Riccaboni P, Faustini M, Battocchio M, Cairoli F, Villani M. (2005) Potential association between placental features and Apgar scores after normal parturition in the thoroughbred horse. *J Anim Vet Adv*; 4:965–70.

Wielgus E, Pawlicki K, Kawa A, Wloch S, Kaminski M. (2000) Fractal analysis of placenta mature villi in healthy, smoking and non-smoking women. *Med Sci Monit*; 6:271–7.

Wilsher S, AllenWR. (2003) The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Vet J*; 35:476–83.

Zigić Z, Marković S, Grbesa D, Ramić S, Halilović A. (2010) Quantitative research of capillaries in terminal villi of mature placentae. *Bosn J Basic Med Sci.*; 10(2): 147-52.

Capitolo 2

ISTOPATOLOGIA QUANTITATIVA APPLICATA ALLA NEUROPATOLOGIA VETERINARIA: ABIOTROFIA CEREBELLARE CANINA, ISTOMORFOMETRIA CEREBELLARE NEONATALE CANINA PER DETERMINAZIONE DELL'ETA IN PATOLOGIA VETERINARIA FORENSE E QUANTIFICAZIONE DI PATTERN SPAZIALE MICROVASCOLARE IN UN CASO DI OLIGODENDROGLIOMA CANINO

Prima Sezione

La prima sezione del presente capitolo è basata sulla pubblicazione:

Bianco C, C Bombardi, G Gandini, A Gallucci, R Sirri, G Sarli and L Mandrioli, 2014. Quantitative pathology of canine cortico-cerebellar degeneration. Pak Vet J, in press

Introduzione

La degenerazione cortico-cerebellare (CCD) o abiotrofia cerebellare è una malattia cronica degenerativa alla cui base si identifica una precoce senescenza delle cellule del Purkinje, o più raramente dello strato dei granuli, attraverso l'attivazione della via apoptotica (Nibe *et al.*, 2010). Ci sono diverse segnalazioni di CCD ad insorgenza precoce (giovani e giovani adulti); sono stati riportati anche casi con esordio in età adulta, ad esempio, in Setter inglese e cani da pastore (Jokinen *et al.*, 2007; Gumber *et al.*, 2010; Vandeveldel *et al.*, 2012.).

La neuroanatomia utilizza gli strumenti morfometrici per descrivere e quantificare le densità neuronali ed i pattern di distribuzione delle cellule del sistema nervoso; in neuropatologia i medesimi strumenti possono fornire dati quantitativi oggettivi più sensibili, per rilevare anche minimi cambiamenti (True, 1996). Tale strumento potrebbe essere proficuamente utilizzato nei casi in cui le informazioni anamnestiche sono carenti o dubbie. I dati bibliografici a riguardo sono frammentari (Koyun *et al.*, 2011).

Materiali e metodi

Animali

Il soggetto affetto da degenerazione cortico-cerebellare era un cane maschio meticcio di 7 anni e quattro mesi, che mostrava lenta e progressiva incoordinazione di tutti e quattro gli arti da tre anni. L'ultimo esame neurologico rivelava segni di grave atassia cerebellare, ipermetria, spasticità e tremore intenzionale. La risonanza magnetica (MRI) dell'encefalo mostrava diminuzione di volume cerebellare. La diagnosi era di abiotrofia cerebellare. A seguito del peggioramento del quadro clinico e della prognosi infausta, il soggetto veniva sottoposto ad eutanasia.

Il soggetto selezionato come controllo era un maschio meticcio di 7 anni e due mesi, sottoposto ad eutanasia per motivi non neurologici. Entrambi i proprietari avevano dato il consenso agli approfondimenti diagnostici post-mortali.

Entrambi i soggetti sono stati sottoposti ad un completo esame *post-mortem*.

Istologia, istochimica ed immunoistochimica

Sono state eseguite le seguenti colorazioni sitologiche ed istochimiche: ematossilina eosina, tionina e Bielchowsky.

E' stata effettuata una prova immunoistochimica con anticorpo policlonale anti-GFAP (Glial fibrillary acidic protein)(anticorpo primario (Dako, USA) per una notte a + 4 ° C). Il sistema di rivelazione è stato il LSAB © kit streptavidina-biotina-perossidasi (Dako, USA), seguita dalla visualizzazione con cromogeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma, USA).

Morfometria

L'encefalo (cervelletto, tronco cerebrale e cervello) dei cani è stato fissato in formalina tamponata al 4% per una settimana. Successivamente è stato misurato il peso dell'encefalo (g), peso (g) ed il volume cerebellare totale (cm³), infine il peso ed il volume delle regioni anatomico-funzionali cerebellari (emisferi laterale e mediale, verme) (Ghez e Thach, 2000).

La fase di patologia microscopica quantitativa è 'stato condotta con ImageJ ver 1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

Lo spessore dello strato molecolare e dello strato delle cellule dei granuli sono stati misurati manualmente (50 misurazioni / strato) su 11 campi microscopici non adiacenti selezionati casualmente ad ingrandimento 100X (field area=986315 μ^2). La densità neuronale delle cellule dello strato dei granuli è stato misurato su sezioni colorate con ematossilina eosina. Dieci campi casuali non adiacenti sono stati acquisiti ad ingrandimento 400X (field area= 60400 μ^2); il conteggio automatico dei nuclei è stata effettuato con il comando "analyze particles" dopo sogliaatura. La densità è stata espressa come neuroni delle cellule dei granuli / 10000 μ^2 . Su sezioni colorate con tionina, la densità lineare delle cellule di Purkinje (neuroni / mm) è stata quantificata in dieci campi casuali non adiacenti a 200 ingrandimenti (area campo 237670 μ^2) per ogni regione anatomica-funzionale. Sulle sezioni allestite con anticorpi anti GFAP la percentuale della superficie occupata da DAB (Diaminobenzidina) è stata misurata mediante la segmentazione manuale del colore su dieci campi casuali non adiacenti di strato molecolare a ingrandimento 400X. L'analisi statistica è stata effettuata con il software Statistica 8™. La distribuzione delle variabili è stata analizzata con il test Shapiro-Wilk. Per i confronti di dati con distribuzione normale è stato utilizzato il T-test, mentre per i dati non normalmente distribuite è stato utilizzato il test di Mann-Whitney U o il test di Kruskal-Wallis. La significatività statistica è stata posta con $p < 0.05$.

Risultati

All'esame necroscopico, il cervelletto del cane riferito per CCD si mostrava armonicamente e diffusamente ridotto di dimensioni, non coprendo totalmente la fossa caudale; i folia cerebellari si mostravano diffusamente più esili, con solchi cerebellari più prominenti. Gli altri organi esaminati macroscopicamente si mostravano nei limiti della norma. Il cervelletto del cane di controllo si mostrava macroscopicamente nei limiti della norma.

Il cervelletto del soggetto con CCD pesava 4,14 grammi e aveva un volume di 4 cm³, il rapporto tra cervelletto ed encefalo era pari a 6,2 %; il cervelletto del cane di controllo pesava 8,14 g e aveva un volume di 9 cm³; il rapporto ponderale cervelletto / encefalo era 9,6 %. In confronto con il cane di controllo (Fig. 4a) il cervelletto del cane con CCD mostrava una grave e diffusa deplezione delle cellule di Purkinje nel contesto di un cervelletto correttamente ed ordinatamente sviluppato (Fig 4b), rispetto al soggetto di controllo (Fig. 4a, riquadro), quelle poche cellule del Purkinje del soggetto con patologia esibivano degenerazione grave (cromatolisi e necrosi) (Fig. 4b, riquadro). In confronto con il cane di controllo (Fig. 4c) la colorazione Bielschowsky evidenziava i processi neuronali residui delle cellule a canestro che delimitano lo spazio occupato da una cellula del Purkinje morta (i cosiddetti "empty basket") (Fig.4d, riquadro). Una moderata gliosi della glia di Bergmann era rilevabile nel soggetto patologico, rispetto al cane controllo (GFAP) (Fig.4e, f).

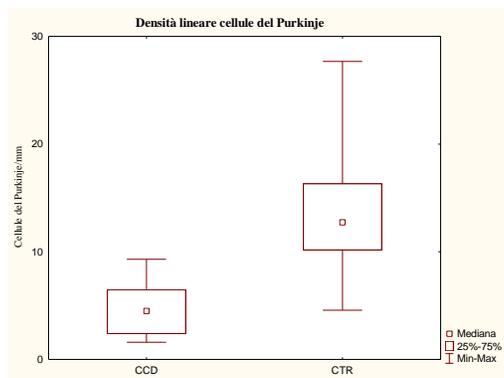


Figura 1: Densità lineare delle cellule del purkinje nel soggetto con CCD e nel soggetto di controllo (CTR). (MW test U: U = 35.00; Z=6.10; p=0.00).

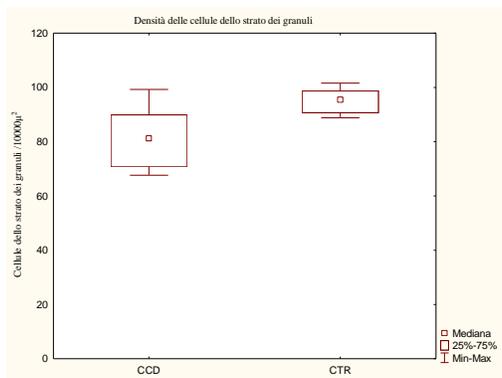


Figura 2: Densità delle cellule dello strato dei granuli nel soggetto CCD rispetto al soggetto normale (CTR). (test MW U: $U = 18.00$; $Z = 2.61$; $p = 0,009175$).

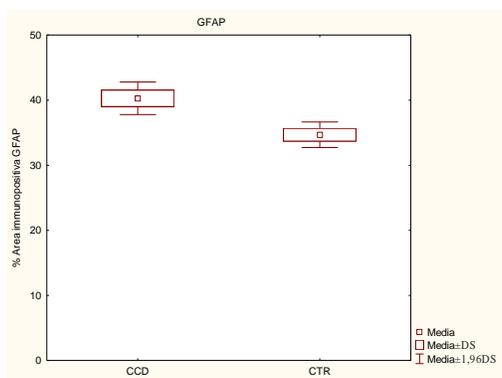


Figura 3: Area percentuale immunopositiva a GFAP nel soggetto CCD rispetto al soggetto normale (CTR) (test t Student; $t = -3.50$; $p = 0,002537$).

I dati della densità lineare delle cellule di Purkinje non erano distribuiti normalmente (test SW: $W = 0.94$; $p = 0.01$). Nessuna differenza significativa di densità lineare delle cellule del Purkinje è stata evidenziata nei tre segmenti anatomico-funzionali cerebellari nei due soggetti. (dati non presentati). La densità lineare delle cellule di Purkinje era significativamente più bassa (MW test U: $U = 35.00$; $Z = 6.10$; $p = 0.00$) nel cane con CCD (mediana = 4,50 / mm ; range: 1,60-9,30) rispetto al controllo (media = 12,74/mm ; range: 4,56-27,67) in tutte le regioni anatomiche - funzionale (dati aggregati) (Fig. 1). I dati delle misurazioni dello spessore dello strato molecolare erano distribuiti normalmente (test SW: $W = 0,98$; $p = 0,6219$); lo spessore dello strato molecolare era significativamente inferiore ($t = 3.192$; $p = 0,001897$) nel cane con CCD (media \pm SD = $256,454 \pm 59.37\mu$), rispetto al cane normale (media \pm SD = $295,722 \pm 63,560 \mu$). I dati sullo spessore dello strato dei granuli non erano normalmente distribuiti (test SW: $W = 0.969$, $p = 0,01941$); lo spessore dello strato granulare non era

significativamente differente tra animali (test MW U 1.052,00, Z=1.364; p = 0,172). Nel cane con CCD la mediana di tale spessore era di 171,174 μ (range: 96,453-269,924), mentre nel cane di controllo 192,717 μ (range: 68,772-363,938). I dati della densità delle cellule dei granuli non erano normalmente distribuiti (test SW: W=0,88; p=0,01717). La densità neuronale dello strato dei granuli, misurata solo nel verme, era significativamente più bassa (test MW U: U=18.00; Z=2.61; p= 0,009175) nel soggetto con CCD (mediana=81.34/10000 μ^2 ; range:67,64-99,24) rispetto al cane di controllo (mediana= 95.53/10000 μ^2 ; range: 88,80-101,58) (Fig.2). I dati delle misurazioni della percentuale di area immunopositiva a GFAP erano normalmente distribuiti (test SW: W=0,92; p=0,1151). L'area percentuale occupata dalla GFAP era significativamente più alta (t=-3.50; p=0,002537) soggetto affetto da CCD (media \pm SD=40.28 \pm 3,83 %) rispetto al cane di controllo (media \pm SD=34.68 \pm 3.31 %) (Fig. 3).

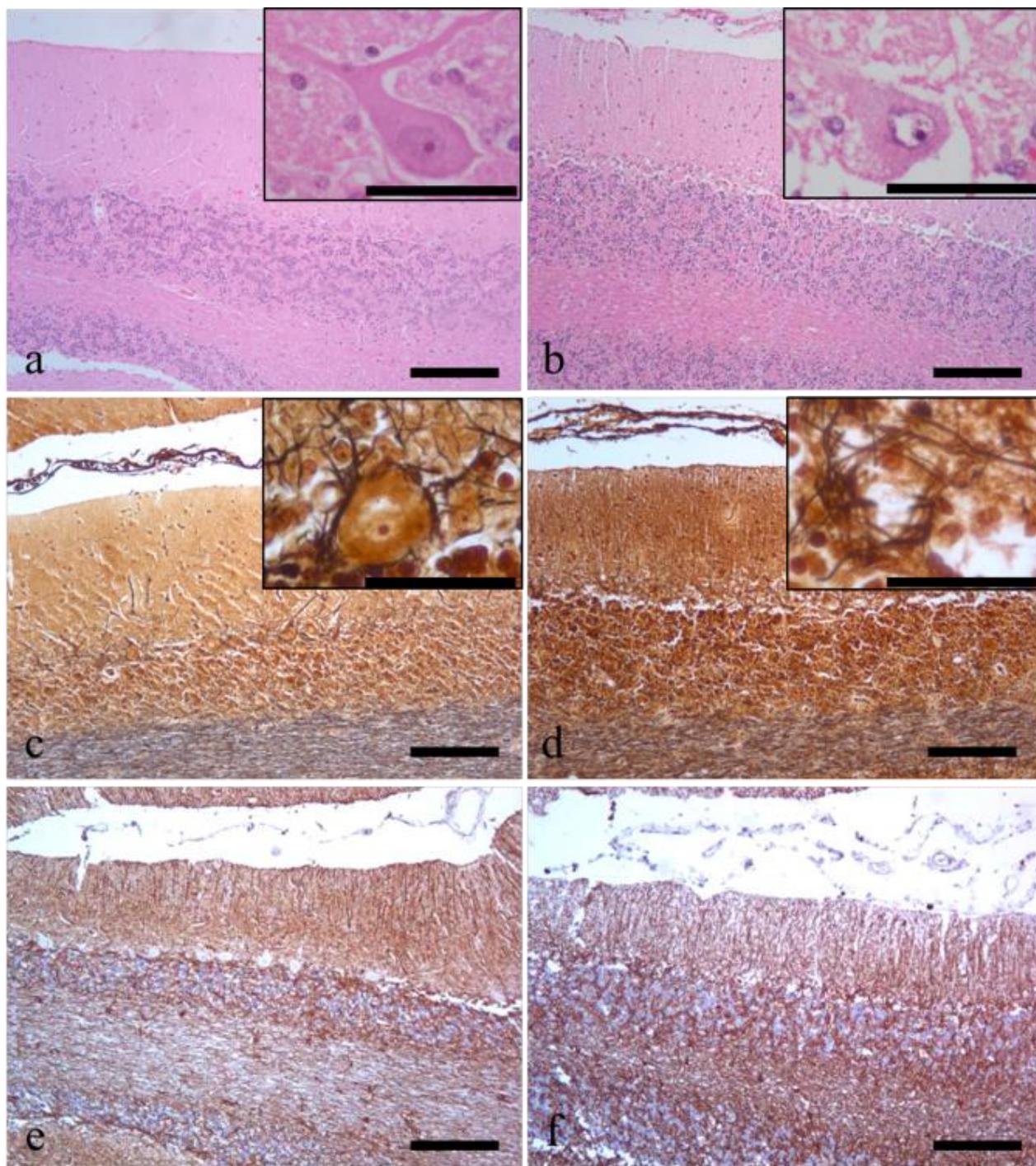


Fig. 4 a,b Cerevelletto (verme), H&E (riferimento metrico=200 μ m). Soggetto con CCD (**a**) a confronto con il normale (**b**) si evidenzia una grave e diffusa scomparsa delle cellule del Purkinje, con quadri degenerative-necrotici a carico dei neuroni residui (insets rif. met.=50 μ m). **c,d** Cerevelletto (verme), impregnazione argentica secondo Bielchowsky (rif. met.=200 μ m). Il cane normale mostra le Purkinje delimitate ed abbracciate dalle cellule a canestro (**c**) mentre il soggetto con CCD (**d**) è caratterizzato dagli "empty basket" (rif. met.=50 μ m). **e,f** cerevelletto, Immunoistochimica GFAP (rif. met.=200 μ m). si apprezza una moderata e diffusa gliosi reattiva della glia di Bergmann nel soggetto con CCD(**f**) a differenza dell'immunolabelling "baseline" del soggetto normale..

Discussione

La CCD generalmente esordisce come un disturbo postnatale progressivo e viene classicamente descritta tra le malattie degenerative del sistema nervoso centrale. Come già detto, è contraddistinta da un precoce invecchiamento selettivo delle cellule di Purkinje; microscopicamente è caratterizzato da una perdita di neuroni di Purkinje accompagnate da una conseguente riduzione dei neuroni dei granuli (Summers *et al.*, 1995). In questo studio la morfometria si è rivelata uno strumento utile per descrivere quantitativamente, cioè misurare le popolazioni cerebellari residue. In particolare lo studio ha mostrato che la densità lineare dei neuroni del Purkinje era significativamente inferiore nel cane con CCD rispetto al cane di controllo in tutte e tre le regioni anatomico – funzionali studiate. In genere, il coinvolgimento del cervelletto nel CCD non è uniforme, inizia a manifestarsi a carico del verme e del lobulo paramediano e si estende agli emisferi laterali (Summers *et al.*, 1995; Vandeveldel *et al.*, 2012.). In questo caso la perdita di cellule di Purkinje era diffusa, pancerebellare, rappresentando una base istopatologica quantitativa del quadro degenerativo in corso da tre anni. La CCD è spesso associata ad un gliosi reattiva (Summers *et al.*, 1995; Vandeveldel *et al.*, 2012.); il labelling GFAP aumentato, descritto nel presente caso, è coerente ad altri casi riportati in Letteratura (Nibe *et al.*, 2010).

Inoltre, in questo caso, lo spessore dello strato molecolare segue una distribuzione normale, mentre lo spessore dello strato di cellule dei granuli non è normale: queste due tendenze statistiche riflettono il tipo di distribuzione dell'area immunocolorata da GFAP (normalmente distribuita) e la densità dei neuroni dei granuli (non normalmente distribuita). La distribuzione della densità lineare delle cellule del Purkinje non è normale. In realtà, è noto che la morte delle cellule di Purkinje segue pattern e modelli topograficamente complessi (Sarna e Hawkes, 2003); nel caso presentato, si può ipotizzare che la morte cellulare delle cellule del Purkinje, avvenuta in modo non casuale, abbia indotto una secondaria morte delle cellule dello strato dei granuli seguendo la stessa topografia e distribuzione statistica. La gliosi reattiva della glia di Bergmann può essere interpretata come un tentativo di sostituzione e rimpiazzo dei processi dendritici delle cellule del Purkinje.

Le fasi pratico-operative sequenziali delle analisi d'immagine possono essere viste come fasi descrittive quantitative di preparati macroscopici e microscopici che poi vengono seguite da una interpretazione e da un inquadramento diagnostico. I dati istomorfometrici quantitativi possono essere correlati con dati laboratoristici o con i reperti della diagnostica per immagini.

Alla luce di queste valutazioni, si sottolinea come l'istologia patologica quantitativa possa essere utile come descrittore dei disordini neurodegenerativi della specie canina, rivelandosi oggettiva, sensibile, e di ausilio nei casi in cui i dati anamnestici siano carenti o frammentari.

Seconda Sezione

Il presente lavoro è stato condotto durante la permanenza presso Veterinary Pathology, School of Veterinary Science, University of Liverpool, nel periodo marzo-giugno 2014. Durante tale periodo il sottoscritto ha sviluppato tale progetto assieme al team composto da: L. Ressel (PhD, DVM, MRCVS Lecturer in Veterinary Pathology, Head of Immunohistology Services), E. Ricci (PhD, DVM, MRCVS Lecturer in Veterinary Pathology), A. Forlani (DIVET, Department of Veterinary Science and Public Health, University of Milano, Italy).

I risultati sono da considerarsi preliminari e non sono ancora stati pubblicati.

Cerebellar histomorphometry for age estimation of the puppy in veterinary forensic pathology.

Bianco C.^a, Forlani A.^b, Ressel L.^c, Ricci E.^c

Introduzione

La determinazione dell'età degli animali può essere determinante – nel segnalamento di un cane, in dispute legali e nei casi relativi all'adeguatezza dei trattamenti veterinari (Cooper, 2006). Quando non è conosciuta, la determinazione dell'età dei cuccioli di solito è stimata sulla base di diversi processi fisiologici maturativi (dentatura, saldatura delle fisi delle ossa lunghe), tra i processi maturativi postnatali, la maturazione della corteccia cerebellare è strettamente legata all'età (Phemister *et al.*, 1968). Per un periodo variabile postnatale specie-specifico, il pattern di maturazione della corteccia cerebellare nei cuccioli di cane, così come nei gattini e nei neonati della specie umana, non è completa e in aggiunta agli strati molecolari, delle cellule del Purkinje e dello strato delle cellule dei granuli, uno strato esterno pluristratificato di neuroblasti fittamente stipati compongono un quarto strato chiamato strato esterno delle cellule dei granuli (EGL). Nei cani, la completa scomparsa di tale strato è si verifica circa 70 giorni dopo la nascita (McGeady *et al.*, 2006; Phemister *et al.*, 1968; Rakic 1971; DeLahunta *et al.*, 2009; Oehmichen *et al.*, 2006; Cumming, 2011) ma una stima dell'assottigliamento della EGL in funzione dell'età non è presente in Letteratura nei cani.

Lo scopo di questo studio è di quantificare tramite analisi di immagine digitale (DIA) la maturazione cerebellare corticale tempo-dipendente in cuccioli di razza diversa, diverso intervallo post mortem e che va da 1 a 75 giorni di età, al fine di indagare l'utilità di tali parametri morfometrici per la determinazione dell'età in patologia veterinaria forense.

Materiali e metodi

Selezione della casistica

In questo studio, sono stati considerati tutti i casi di esame *post mortem* di cuccioli negli archivi (2004-2013) della Sezione di Patologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Liverpool. I criteri di inclusione erano rappresentati dalla disponibilità di preparati istologici (ematossilina-eosina) di una sezione paramediana di cervelletto, età nota inferiore a 75 giorni, razza conosciuta, e l'assenza di malattie cerebellari congenite/acquisite

La casistica selezionata è stata divisa in tre classi di età: A: 0-25 gg; B: 26-50 gg; C: 51-75 gg.

Analisi d'immagine

Tutte le procedure di analisi delle immagini digitali sono state effettuate con il software open source Fiji, su ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>; <http://imagej.nih.gov/ij>).

Sono state acquisite fotografie digitali di campi microscopici con un microscopio Nikon dotato di una fotocamera digitale. Per ogni caso è stata ottenuta una microfotografia a 20X di ingrandimento (jpeg, 3664x2740 pixel, field area = 147410 μm^2). Le misurazioni morfometriche sono state condotte da un secondo patologo, come segue: in ogni foto in cinque posizioni ad una distanza di 50 micron lungo le Folia cerebellari sono stati misurati gli spessori dello strato molecolare (MLT) e lo spessore dello strato esterno dei granuli (EGLT); le misure sono state espresse in micron. Per ogni foto il grado di maturazione (EGL) è stato espresso come rapporto tra il valore medio di EGLT e MLT, ed espresso in percentuale (%). Inoltre per ciascun preparato sono state acquisite cinque microfotografie a 40X di ingrandimento. Lo spessore espresso come numero di neuroblasti formanti l'EGL è stata misurata su ciascuna delle cinque fotografie a 40X da un secondo patologo (jpeg, 3664x2740 pixel, jpeg, zona campo = 36465 μm^2) nella posizione con la più alta cellularità, ed espressa come numero di cellule / EGL.

Analisi statistica

Tutte le procedure statistiche sono state condotte con Statistica8TM (StatSoft). I dati sono stati testati per la normalità della distribuzione con il test Shapiro-Wilkinson, e se i criteri di normalità non erano soddisfatti, sono stati condotti test non parametrici (Kruskal-Wallis per il confronto multiplo; Kruskal-Wallis post hoc per confronti a coppie; Spearman R per la correlazione). I dati a distribuzione normale sono stati testati con ANOVA. Il livello di significatività è stato fissato a $p = 0,05$.

Risultati

Sono stati selezionati 30 casi da un totale di 130 record disponibili, in quanto coerenti con i criteri sopra elencati. Brevemente, sono state rappresentate 19 razze di cuccioli di 14 età diverse (0-70gg); si fa riferimento alla tabella 1 per il segnalamento della casistica.

Trial id	Peso (kg)	Razza	Età (giorni)	Genere
1	0,345	Spaniel	9	NF
2	0,560	Labrador	10	F
3	2,280	Lurcher cross	42	F
4	2,680	Lurcher	42	F
5	2,100	Cavalier King Charles Spaniel	56	M
6	3,200	Labrador	56	M
7	6,400	Weimaraner	56	M
8	NG	Griffon Belgique	4	NF
9	1,400	Tamaskan	49	M
10	1,562	Staffordshire Bull Terrier	28	M
11	0,215	Labrador	1	F
12	1,100	Pekingese	49	M
13	0,790	Cross Breed	42	F
14	1,300	German Shepard	35	F
15	0,543	Yorkshire Terrier	56	F
16	1,370	Rottweiler	28	F
17	0,677	Chihuahua	70	M
18	0,22	Springer Spaniel	3	M
19	0,675	Lurcher	5	M
20	4,240	Afgan hound	60	F
21	2,500	German Shepard	35	F
22	0,500	York Shire Terrier	56	M

23	0.9	York Shire Terrier	56	M
24	0.800	Yorkshire Terrier	70	M
25	2,800	Lurcher cross	70	M
26	0,255	Pekingese	2	M
27	0,432	Rottweiler	35	F
28	NF	Pug	35	F
29	2,700	Labrador cross Staffordshire Bull Terrier	49	M
30	0,400	Maltese	49	F

Tabella 1: Dati relative al segnalamento della casistica selezionata (NF=non fornito)

Il cervelletto degli animali della classe di età A (animali neonati) era caratterizzato da uno strato molecolare sottile con un prominente EGL densamente popolato da due popolazioni: un bordo esterno di cellule allungate con nuclei ovali (neuroblasti), e uno strato interno di cellule, con nuclei rotondi (neuroni dei granuli premigratori) (Figura 1). Numerose cellule tonde (granuli migratori) erano sparsi tra EGL e strato delle cellule del Purkinje, all'interno dello strato molecolare. Il cervelletto dei cuccioli di classe B, mostrava uno strato molecolare maggiormente sviluppato, mentre la EGL era ancora riconoscibile come uno strato continuo di spessore pari ad uno o due neuroblasti. Il cervelletto dei cuccioli di classe C, infine, erano caratterizzati da uno strato molecolare prominente, scarsamente cellulare ed un esiguo e discontinuo strato esterno dei granuli.

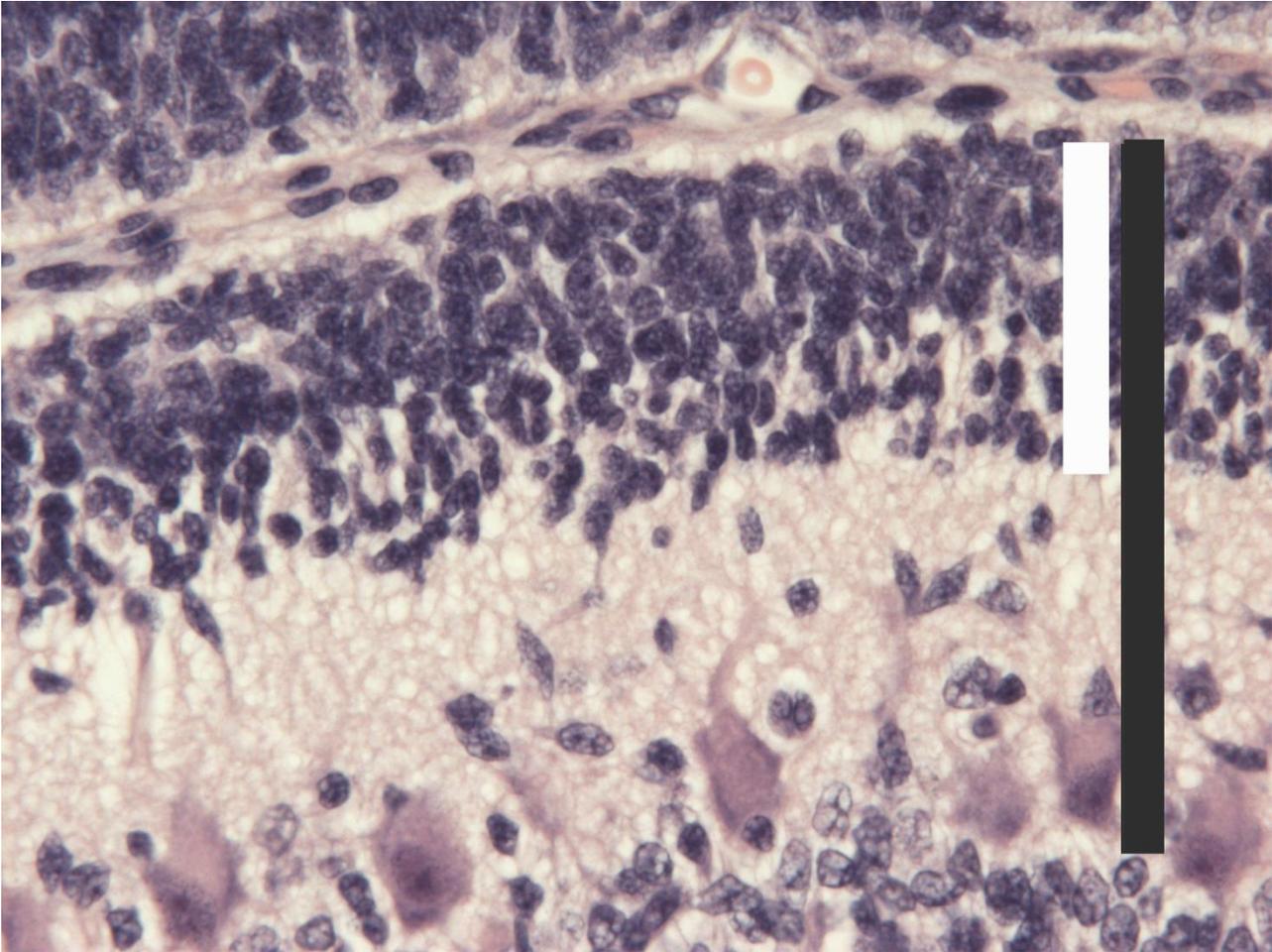


Figura 1: misure morfometriche utilizzate per la stima dell'età: Fotografia microscopica del preparato di cervelletto- soggetto id 8, (4 giorni) il segmento nero indica lo spessore dello strato molecolare (MLT), il segmento bianco indica invece lo spessore dello strato esterno dei granuli (EGL). MLT=71.7 μ ; EGL=34.5 μ . Spessore medio del EGL, espresso come numero di neuroblasti formanti l'EGL=9.

I dati morfometrici sono presentati nella tabella 2. La variabile peso non era normalmente distribuita ($W = 0,90508$. $P = 0,01120$). Lo spessore dello strato molecolare era normalmente distribuito (Shapiro-Wilk $W = 0,96794$ $p = 0,48455$); l'EGLT (Shapiro-Wilk $W = 0,78747$ $p = 0,00004$); la % EGL strato / molecolare ($W = 0,73773$. $P = 0,00001$) e lo spessore cellulare del EGL (Shapiro-Wilk $W = 0,83714$. $p = 0,00034$) non erano normalmente distribuiti. La correlazione tra età e percentuale EGLT / MLT (Spearman $R = -0,8464$; $p = 0,0000$) e tra l'età e lo spessore cellulare EGL (Spearman $R = -0,7968$; $p = 0,0000$) era, per entrambe le associazioni, significativa ed inversamente proporzionale.

La retta di regressione costruita con i dati dello spessore cellulare dell'EGL e l'età è riportato nella figura 2.

Classe età	(n)	Età (giorni)	Peso(kg)	MLT (μ)	EGLT (μ)	% EGLT/MLT	EGCL (cellule)
A	7	4 (1-10)	0,3 (0,215-0,675)	83,22±22,35	32,61 (25,25-75,61)	43,08 ^a (30,32-65,70)	8,6 ^a (7,2-9,0)
B	13	42 (28-49)	1,385 (0,400-2,700)	157,82±56,4 1	5,44 (0,00 - 34,69)	5,91 ^b (0,00-19,46)	3,2 ^b (0,8-4,8)
C	10	56 (56-70)	1,500 (0,500-6,400)	212,28 ±52,84	0,00 (0,00-10,17)	0,00 ^b (0,00-3,61)	1,1 ^b (0,4-2,4)

Tabella 2: Dati morfometrici e clinici sintetici: I dati sono presentati per ciascuna classe di età. I dati distribuiti normalmente vengono presentati come media±deviazione standard, i dati a distribuzione non normale vengono presentati come mediana, massimo e minimo. ^{a,b} indicano differenze statisticamente significative (*post hoc* K-W test per confronti a coppie; $p < 0.05$).

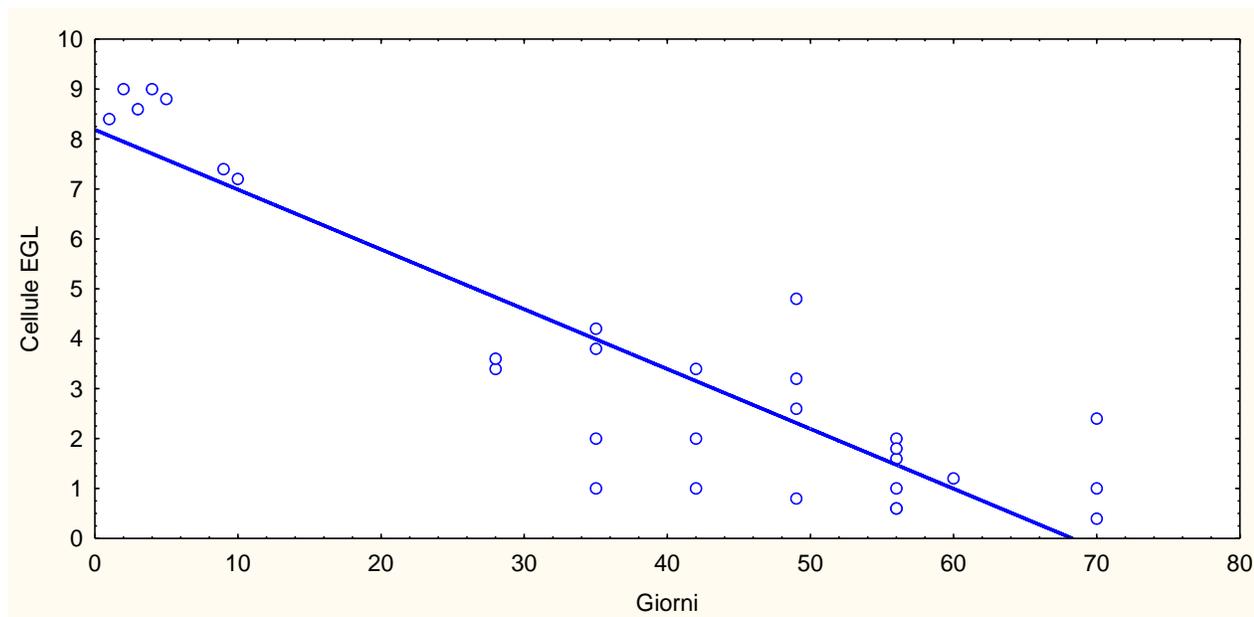


Figura 2 “Age estimation plot”: retta di regressione dello spessore EGL espresso come numero di cellule neuronali in funzione dell’età (Spearman rho=-0,7968; $p=0,0000$).

La migrazione centripeta delle cellule dello strato dei granuli durante la maturazione corticale è associata con la riduzione di spessore del EGL e l'aumento sincrono dello spessore del MLT. Il fenomeno biologico indagato, cioè la maturazione postnatale tempo-dipendente della corteccia cerebellare, la differenziazione e la migrazione, è in accordo con i dati pubblicati precedentemente nel cane (Phemister *et al.*, 1968). Sono stati utilizzati cuccioli da 19 razze di cani convenzionali di età diverse (14 età), mentre i citati riferimenti hanno fatto uso di una o poche razze (Beagle o razze non specificate) in un setting sperimentale con meno numerosi momenti di campionamento (sei età). Nonostante l'estrema variabilità nelle razze canine incluse, è stato dimostrato che i parametri morfologici di maturazione della corteccia cerebellare non sono stati influenzati dal peso del soggetto mentre invece erano altamente correlati con l'età dell'animale. Abbiamo trovato che sia lo spessore del EGL ed il rapporto tra EGL e MLT sono indicatori altamente sensibili della maturazione della corteccia cerebellare. Quest'ultimo, in particolare, è apparso come il parametro più utile, mostrando una forte correlazione tra la progressiva maturazione della corteccia cerebellare e l'età dell'animale, ed inoltre non è influenzato dal peso del soggetto. Questo indicatore semiquantitativo è utile perché incorpora obiettività, affidabilità e rapidità di esecuzione (Gibson-Corley *et al.*, 2013). Ma il metodo più affidabile e veloce per la stima dell'età è il conteggio delle cellule (neuroblasti) costituenti l'EGL in 5 campi microscopici a 400X, valutando la zona più cellulare; il valore ottenuto può essere quindi interpolato usando la retta di regressione (Figura 2), giungendo così alla stima della classe di età. (tabella 1). Tale metodo non richiede una fase di acquisizione delle immagini e di misurazione. L'età degli animali raccolti non è stata normalmente distribuita, bensì si apprezzava un pattern bimodale, con la visualizzazione di due picchi a 0-7 giorni e circa 45 giorni, questa distribuzione non normale potrebbe riflettere due importanti classi d'età ad alto rischio di mortalità nel cucciolo, cioè la mortalità è elevata nella prima settimana di vita per problemi congeniti o al parto, ed al momento della decremento dell'immunità materna passiva (blanketing) (2 mesi) (Tønnessen *et al.*, 2012). Il presente trial suggerisce che i parametri maturativi corticali cerebellari, espressi in percentuale del rapporto EGLT / MLT e spessore cellulare del EGL possano essere utili strumenti in mano al patologo nella stima e determinazione dell'età dei cuccioli, assieme ad altre indagini non anatomo-istopatologiche (radiologia).

Terza Sezione

Il presente studio rappresenta un approfondimento di un case report:

M. Menchetti, L. Mandrioli, F. Rossi P. Laganga, C. Bianco, A. Gallucci, C. Cantile, G. Gandini
LONG TERM SURVIVAL ASSOCIATED WITH SUSPECTED CEREBROSPINAL FLUID
PATHWAYS DISSEMINATION OF AN OLIGODENDROGLIOMA IN A DOG. 27th symposium of
the European College of Veterinary Neurology 18-20 sept 2014 -Madrid. Poster 63

Indice di Clark-Evans come indicatore sintetico di disposizione spaziale della componete microvascolare tumorale: applicazione in un caso di oligodendroglioma di cane

Introduzione

Nel tessuto cerebrale adulto normale, la formazione dei vasi sanguigni è sottoespressa. Tuttavia i processi patologici, quali i tumori cerebrali, possono aumentare la proporzione di cellule endoteliali coinvolte nell'angiogenesi. Quando questo processo è iniziato, una complessa serie di eventi molecolari esita con la formazione di nuovi vasi (Lim *et al.*, 2006). I tumori cerebrali sono caratterizzati da una rete microvascolare che differisce dalla normale vascolarizzazione cerebrale. Tumori diversi mostrano pattern angioarchitetonici diversi. O addirittura si riscontrano eterogeneità microvascolari all'interno di un istotipo neoplastico. È stato dimostrato che la quantificazione di pattern microvascolari potrebbe essere utilizzata in combinazione con il grado istologico per la caratterizzazione del tumore e per finalità prognostiche, anche se parametri oggettivi ad oggi non sono stati ancora stati convalidati (Assimakopoulou *et al.*, 1997; Di ieva, 2011) La comprensione dei pattern vascolari è importante per le di terapie antiangiogeniche in setting clinici. È stato evidenziato che il glioblastoma multiforme, che presenta un pattern vascolare bizzarro, per esempio, può non rispondere alla terapia antiangiogenica, mentre un angioarchitettura vascolare più omogenea può essere un bersaglio valido per i farmaci chemioterapici (Birner *et al.*, 2003). Le reti microvascolari neoplastiche possono essere rilevate con metodi immunologici (ad esempio, immunoistochimica) nei campioni istologici. Deve essere inoltre ricordato che il potenziale metastatico dei gliomi è eccezionalmente raro

(Hayat, 2012), e dunque la terapia antiangiogenetica è estremamente importante. I parametri fino ad oggi adottati nello studio della componente vascolare dei tumori cerebrali sono stati: densità microvascolare, parametri euclidei (area vasi, diametro medio vasi, perimetro vasi) e parametri non euclidei, quali la dimensione frattale (Di Ieva, 2011). In neuropatologia veterinaria i dati riguardanti le peculiarità angioarchitettoniche delle neoplasie primitive cerebrali sono scarsi. Il presente studio si propone di applicare il software Ka-Me (Khiripet *et al.*, 2012), per quantificare la distribuzione spaziale dei vasi (oggetti di interesse) attraverso l'indice di aggregazione di Clark-Evans, all'interno di una struttura di riferimento (campo microscopico), in un oligodendroglioma di cane; si valuterà poi nei medesimi campi la densità microvascolare. Le correlazioni tra i due parametri saranno valutate e discusse. Il software utilizzato calcola mediante un procedimento interattivo (non automatico) l'indice di aggregazione di Clark Evans, oltre a numerosi altri parametri (Gabriel graphs, minimal spanning trees, Ulam trees, Pitteway tests, circumcircles e convex hulls) (Khiripet *et al.*, 2012).

Materiali e metodi

Il presente studio ha utilizzato preparati immunoistochimici ottenuti da un caso di oligodendroglioma di III grado in un cane, oggetto di un case report (Menchetti *et al.*, 2014). L'oligodendroglioma è un tumore primitivo tipicamente prosencefalico nella specie canina che origina dalle cellule staminali multipotenti, presenti nel cervello durante le fasi organogenetiche e nella vita adulta. Tale lesione neoplastica è generalmente fatale (Vandeveld, 2012). Il soggetto era un cane maschio, intero, di razza Corso, di 6 anni. La neoplasia sottoposta ad approfondimento immunoistochimico obliterava ed infiltrava il IV ventricolo. È stata effettuata una prova immunoistochimica con anticorpi anti fattore VIII related antigen (FVIII-RA; diluizione 1:8000; DAKO). Sono state acquisite immagini microscopiche ad ingrandimento 20x con un microscopio Nikon e fotocamera Nikon (Jpeg; 1280x960 pixel) di 15 campi non adiacenti di neoplasia e 5 campi non adiacenti di encefalo normale. La densità microvascolare è stata calcolata mediante conteggio manuale dei vasi ed è stata espressa come numero di vasi/10000 μ^2 , attraverso il software di analisi d'immagine fiji su imagej (<http://imagej.nih.gov/ij/>). L'indice di Clark Evans è stato calcolato con il software Ka-me, selezionando manualmente tutti i vasi della foto microscopica.

Analisi statistica

La distribuzione dei dati è stata analizzata con il test di Kolmogorov-Smirnov. I dati non distribuiti normalmente sono stati confrontati con test di Mann-Whitney; i dati distribuiti normalmente sono stati paragonati con test t di Student; la correlazione è stata indagata con il test di Spearman.

Risultati

I preparati immunohistochimici mostravano positività citoplasmatica bruno omogeneo della componente vascolare (figura1). La densità microvascolare si mostrava distribuita normalmente (K-S $d=,08385$, $p>,20$; Lilliefors $p>,20$); l'indice di Clark-Evans mostrava invece una distribuzione non normale (K-S $d=,19213$, $p>,20$; Lilliefors $p<,05$). La densità microvascolare dell'oligodendroglioma era pari a $6,56\pm 2,43$ vasi /10000 μ^2 ; mentre l'encefalo normale era caratterizzato da un valore di $2,48\pm 0,80$ vasi/10000 μ^2 . La differenza era statisticamente significativa (MW: $p=0,0019$). L'indice di Clark-Evans della componente vascolare neoplastica era pari a 1,34 (mediana; range=1,35-2,09), significativamente diverso (MW; $p=0,02$) da quello del parenchima cerebrale normale (mediana=1,59; range=0,53-1,73). La correlazione tra le due variabili era uguale a -0,53 ed era significativa ($p<0,05$).

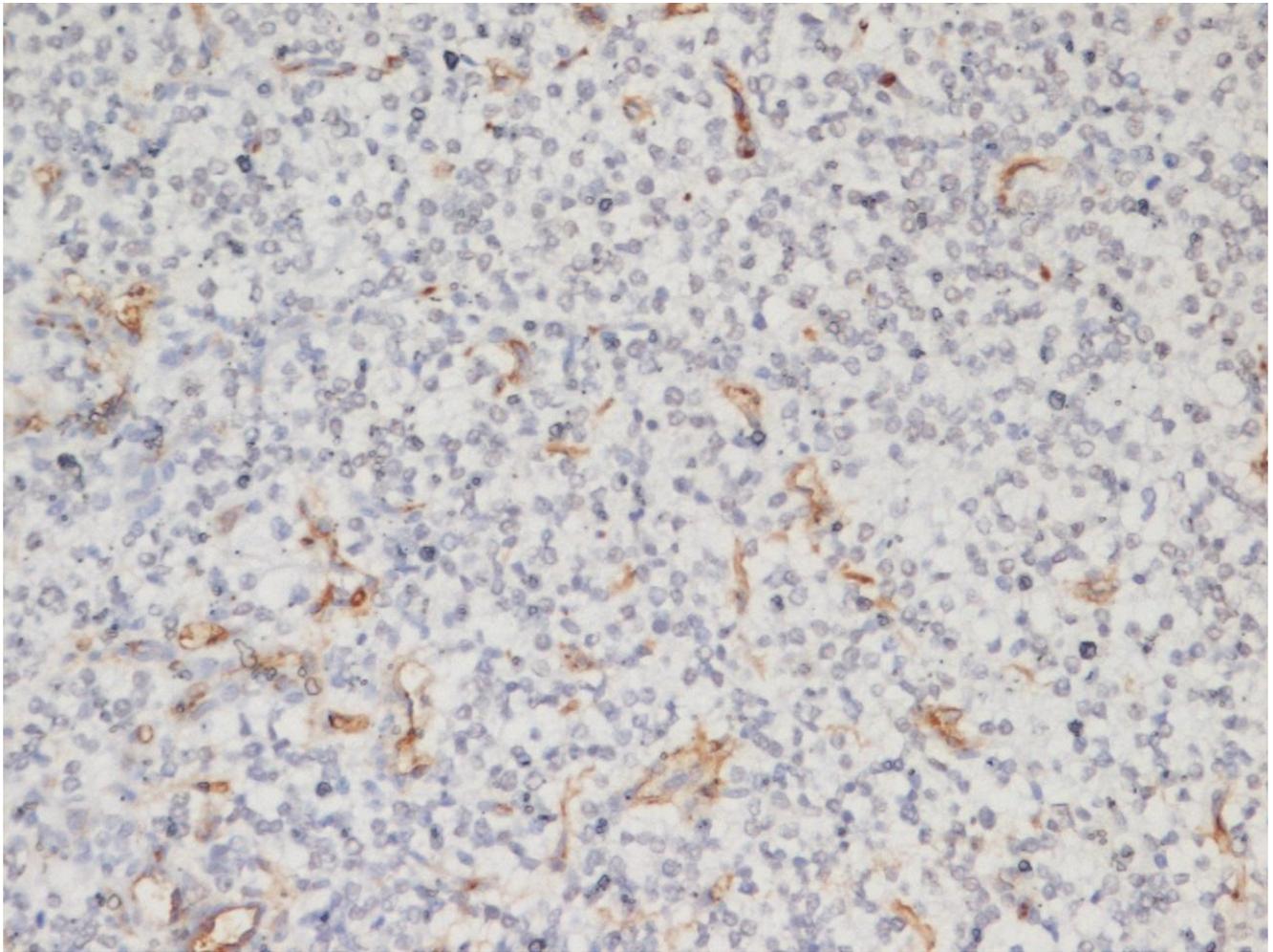


Figura 1: Oligodendroglioma di III grado, sezione immunoistochimica FVIII-RA (Obj=20x). Densità microvascolare=11,31 vasi/10000 μ^2 , indice di Clark-Evans=1,34.

Discussione

L'indice di Clark-Evans analizza un pattern spaziale di punti (posizioni degli oggetti di interesse) distribuiti all'interno di una struttura di riferimento (spazio bidimensionale). Questa analisi permette, in particolare, di valutare la deviazione dalla casualità dello spazio, e rivela le tendenze verso il clustering (attrazione) o la regolarità (repulsione). Tipicamente l'interesse principale è nel rilevare se un pattern spaziale di punti si comporta in modo casuale, poiché ciò significherebbe che non esistono interazioni tra i punti stessi. Questa condizione è indicata come Casualità spaziale completa (Complete Spatial Randomness). Tuttavia, è più interessante quando il pattern di punti si discosta da questa natura casuale, sia manifestando regolarità nell'organizzazione spaziale dei punti o formando gruppi di punti (cluster). Per quantificare e confrontare la disposizione spaziale dei punti, sono necessari indicatori

sintetici statistici spaziali (spatial statistics) che ne descrivono le caratteristiche. Nel caso presentato, si evince come la distribuzione della componente microvascolare neoplastica tenda alla casualità, se confrontata con i vasi dell'encefalo normale. Si sottolinea inoltre come sia presente una significativa correlazione inversa tra densità microvascolare ed indice di Clark-Evans, probabilmente questo indicatore sintetico spaziale evidenzia l'angiogenesi tumultuosa ed anarchica della neoplasia, se confrontata alla costellazione vascolare ordinata dell'encefalo normale.

L'indice di Clark-Evans è stato applicato raramente in istopatologia (Rolauffs et al., 2010), per valutare l'aggregazione dei condrociti in contesti osteoartritici. Si vuole sottolineare come a tutt'oggi le più numerose applicazioni del metodo di Clark-Evans provengano dall'ecologia, dove lo scopo principale è capire, descrivere ed interpretare l'abbondanza e la distribuzione di risorse ed organismi (Clark e Evans, 1954).

Essenzialmente, nelle descrizioni istopatologiche, gli oggetti di interesse (cellule, cluster, strutture sovracellulari) vengono spesso descritte come omogeneamente disposte, sparse, casualmente organizzate. Il qui presente metodo di analisi di immagine vuole fornire al patologo un descrittore quantitativo del pattern spaziale di eventi nel campo di riferimento microscopico. Il patologo può essere chiamato a descrivere una densità di eventi/fenomeni nello spazio (cellule infiammatorie, cellule neoplastiche, nuclei positivi ad un immunolabelling), può volere descrivere una forma, attraverso indicatori di shape metrics (circolarità, dimensione frattale), oppure può quantificare, mediante questo indice di aggregazione, la modalità della distribuzione spaziale di eventi/oggetti di interesse (pattern spaziale microvascolare nel presente caso). Si sottolinea come tutti i parametri morfometrici siano indicatori oggettivi descrittivi continui, che poi richiedono una fase di interpretazione.

In conclusione, lo studio presentato vuole proporre l'utilizzo dell'indice di Clark-Evans come parametro morfometrico utile per la quantificazione del pattern spaziale vascolare in campo istopatologico.

Bibliografia

- Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Papadakis N, Varakis I. (1997) Microvessel density in brain tumors. *Anticancer Res.*; 17(6): 4747-53.
- Birner P, Piribauer M, Ingeborg F, Gatterbauer B, Marosi C, Ambros P, Ambros IM, Bredel M, Oberhuber G, Roessler K, Budka H, Harris AL, Hainfellner JA. (2003) Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. *Brain Pathol* 13: 133- 143.
- Clark PJ, Evans FC. (1954) Distance to Nearest Neighbor as a Measure of Spatial Relationships in Populations. *Ecology* 35:445–453.
- Cooper JE, Cooper ME. (2007) Introduction to Veterinary and Comparative Forensic Medicine. Blackwell Publishing Ltd Editor(s).
- Cummings PM, Trelka DP, Springer KM. (2011) Post-injury intervals. In *Atlas of Forensic Histopathology*. Cambridge University Press 2011. pp. 1-27.
- deLahunta A, Glass EN, Kent M. (2014) Cerebellum. In *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology* 4th Ed. Saunders; 2014. pp. 368-408.
- Di Ieva A, Grizzi F, Sherif C, Matula C, Tschabitscher M. (2011) Angioarchitectural heterogeneity in human glioblastoma multiforme: a fractal-based histopathological assessment. *Microvasc Res.*; 81(2):222-30.
- Ghez C, W Thach. (2000) The cerebellum. In: *Principles of neural science* (Kandel E, Schwartz J, Jessell T, eds): McGraw Hill, New York, USA, 832-852.
- Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. (2013) Principles for valid histopathologic scoring in research. *Vet Pathol.*; 50(6):1007-15.
- Gumber S, Cho DY, TW Morgan TW, 2010. Late onset of cerebellar abiotrophy in a Boxer dog. *Veterinary Medicine International Article ID 406275*, pp: 1-4 doi:10.4061/2010/406275
- Hayat MA (2012) Tumors of the central nervous system Vol.8, Astrocytoma, medulloblastoma, retinoblastoma, chordoma, craniopharyngioma, oligodendroglioma, and ependymoma. Dordrecht: Springer,
- Jokinen TS, Rusbridge C, Steffen F, Viitma R, Syrja P, de Lahunta A, Snellman M and Cizinauskas S (2007) Cerebellar cortical abiotrophy in Lagotto Romagnolo dogs. *J Small Anim Pract*, 48: 470-473.
- Khripet N, Khantuwan W, Jungck JR. (2012) Ka-me: a Voronoi image analyzer. *Bioinformatics*;28(13):1802-4.

- Koyun N, Aydinlioglu A, Aslan K. (2011) A morphometric study on dog cerebellum. *Neurol Res*, 33: 220-224.
- Lim M, Cheshier S, Steinberg GK. (2006) New vessel formation in the central nervous system during tumor growth, vascular malformations, and Moyamoya. *Curr Neurovasc Res* ;3(3):237-45.
- McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT (2006) Nervous system in: McGeady T.A., Quinn P.J., FitzPatrick E.S., Ryan M.T., Cahalan S. *Veterinary Embryology* Published by Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2006; 153-183.
- Menchetti M, Mandrioli L, Rossi F, Laganga P, Bianco C, Gallucci A, Cantile C, Gandini G. Poster: Long term survival associated with suspected cerebrospinal fluid pathways dissemination of an oligodendroglioma in a dog. 27th symposium of the European College of Veterinary Neurology 18-20 sept 2014 -Madrid. 63.
- Nibe K, Nakahama H, Uchida K. (2010) Comparative study of cerebellar degeneration in canine neuroaxonal dystrophy, cerebellar cortical abiotrophy, and neuronal ceroid-lipofuscinosis. *J Vet Med Sci*, 72: 1495-1499.
- Park HS, Chang IY, Kim HY, Yoon SP. (2014) Immunolocalization of Ephexin-1 in the Developing Canine Cerebellum. *Neuroscience & Medicine*.; 5: 9-14.
- Phemister RD, Young S. (1968) The postnatal development of the canine cerebellar cortex. *J. Comp. Neur.*; 134 (2): 243–253.
- Rakic P. (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. *J. Comp. Neur.*; 141(3): 283–312.
- Rolauffs B, Muehleman C, Li J, Kurz B, Kuettner KE, Frank E, Grodzinsky AJ. (2010) Vulnerability of the superficial zone of immature articular cartilage to compressive injury. *Arthritis Rheum.*;62(10): 3016-27.
- Sarna J, Hawkes R. (2003) Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol*, 70: 473-507.
- Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A. (1995) Hereditary, familial, and idiopathic degenerative diseases. In: *Veterinary neuropathology* (Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A, eds): Mosby-Year Book, St Louis, USA 208-350.
- Tønnessen R, Borge KS, Nødtvedt A, Indrebø A. (2012) Canine perinatal mortality: A cohort study of 224 breeds *Theriogenology*.; 77(9):1788-801.
- True LD. (1996) Morphometric applications in anatomic pathology. *Human Pathol*, 27: 450-467.

Vandeveld M, Higgins RJ, A Oevermann A. (2012) Veterinary Neuropathology. Essentials of theory and practice (Vandeveld M, Higgins RJ, Oevermann A, eds): Wiley-Blackwell, Ames, USA.

Capitolo 3

ISTOPATOLOGIA QUANTITATIVA APPLICATA ALLA VALUTAZIONE DELLE PATOLOGIE IPERPLASTICO-DEGENERATIVE ADATTATIVE DEL TRATTO ENTERICO E DEL PARENCHIMA EPATICO IN PESCI PIATTI ALLEVATI

Prima Sezione

La prima sezione del presente capitolo è basata sulla pubblicazione:

Sirri R, **Bianco C**, De Vico G, Carella F, Bonaldo A, Sarli G, Tondini G, Mandrioli L. Proliferation, apoptosis, and fractal dimension analysis for the quantification of intestinal trophism in sole (*Solea solea*) fed mussel meal diets. *BMC Vet Res.* 2014; 10:148.

Proliferazione, apoptosi, ed analisi della dimensione frattale per la quantificazione del trofismo intestinale in *Solea solea* alimentata con diete a base di farina di mitili.

Introduzione

La valutazione del trofismo intestinale, principalmente dell'epitelio mucosale, è importante in diverse condizioni associate a patologie, atrofia e guarigione dell'intestino. L'integrità della barriera mucosale e la velocità di proliferazione ed apoptosi sono variabili rilevanti spesso usate (de Aguilar-Nascimento, 2006). Per numerose indagini, sono stati spesso utilizzate variabili quantitative morfometriche quali altezza dei villi, profondità cripta e l'altezza degli enterociti (de Aguilar-Nascimento, 2006). Focalizzando l'attenzione sui teleostei allevati, l'esame istologico del sistema digestivo è considerato un buon indicatore non solo dello stato nutrizionale ma anche dello stato di salute (Rašković *et al.*, 2011). L'intestino e il fegato sono gli organi più importanti nella digestione e l'assorbimento dei nutrienti e, quindi, il monitoraggio di questi organi viene ritenuto necessario. I villi intestinali dei mammiferi e degli uccelli sono approssimabili con forme euclidee (forma cilindrica) e permettono l'impiego dei parametri morfometrici classici. Le peculiarità morfologiche dell'intestino del pesce, tra cui l'assenza di cripte intese come compartimenti distinti e la presenza di pieghe o folding longitudinali della mucosa anziché villi (Lumsden, 2006), non consentono l'utilizzo di questo approccio morfometrico classico. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la cinetica di proliferazione ed apoptosi degli enterociti mediante immunoistochimica e successivamente, per valutare lo sviluppo e la complessità della mucosa intestinale, è stata calcolata la dimensione frattale dell'epitelio mucosale in *Solea solea* alimentata con diverse diete sperimentali.

Materiali e metodi

Il trial sperimentale in vivo è stato valutato e approvato dal Comitato Etico-Scientifico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Bologna, in conformità della direttiva del Consiglio della Comunità europea (86/609 / ECC). I pesci sono stati ottenuti dal campionamento finale di un esperimento di accrescimento/ingrasso effettuato presso il Laboratorio di Acquacoltura, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italia. Prima dell'inizio del trial, 840 giovanili di *Solea solea* ($13,1 \pm 2,3$ g di peso corporeo medio iniziale) sono stati distribuiti con criterio randomizzato in dodici vasche da 500 l (superficie: $0,64 \text{ m}^2$) (70 individui/vasca). Ogni dieta sperimentale è stata testata in triplicato. Le diete sperimentali erano isoproteiche (53%) e isolipidiche

(11%), offerte a sazietà sottoforma di pellet. Le diverse diete contenevano livelli gradualmente crescenti di farina di mitili (Mussel meal=MM) (0%, 25%, 50%, e il 75%, rispettivamente, definite MM0, MM25, MM50, MM75) per sostituire la farina di pesce (Fish Meal=FM). Alla fine del trial sperimentale, il peso medio \pm deviazione standard delle sogliole ($n = 3$ serbatoi, 70 animali in ogni serbatoio) era $32,4 \pm 3,4$, $42,4 \pm 0,9$, $46,0 \pm 1,3$ e $46,0 \pm 3,0$ g nei gruppi alimentati con MM0, MM25, MM50 e MM75 rispettivamente. Alla fine della sperimentazione, tre pesci per ciascuna vasca (totale di 36 animali) sono stati campionati per approfondimento istologico. Dopo l'eutanasia con una dose letale di 2-fenossietanolo, l'intestino è stato rimosso ed è stato suddiviso in tre segmenti (anteriore, intermedio e posteriore); da ogni segmento, un campione di 5 mm di lunghezza è stato sezionato e fissato in formalina tamponata al 10%. I campioni sono stati poi processati come di routine (inclusione in paraffina, taglio al microtomo e colorazione con ematossilina ed eosina) al fine di ottenere sezioni trasversali di ciascun segmento. Le sezioni sono state valutate al microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i, Nikon Corporation, Giappone) per rilevare e descrivere alterazioni degenerative e infiammatorie. Sono state quindi allestite sezioni trasversali seriali e sono state processate per la determinazione del turnover intestinale con metodica combinata (immunoistochimica ed analisi d'immagine). Il tasso di proliferazione degli enterociti è stato valutato con procedura immunoistochimica volta ad identificare l'antigene nucleare della proliferazione cellulare (PCNA). Le sezioni sono state deparaffinate per 30 min in Solvent plus (Carlo Erba Reagents Srl, Italia) ed idratate in una serie di alcoli a concentrazione decrescente. In seguito, l'attività perossidasi endogena è stata bloccata con 3% di perossido di idrogeno in acqua distillata per 30 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi trattate in tampone citrato (pH 6,0) per 10 minuti in un forno a microonde (750 W) per lo smascheramento antigenico. Il legame aspecifico è stato bloccato incubando le sezioni con 5% di normal goat e 1% di siero albumina bovina (BSA) in tampone PBS per 1 ora a temperatura ambiente e quindi le sezioni sono state incubate overnight a 4 ° C con il l'anticorpo monoclonale murino anti-PCNA (clone PC10, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) diluito 1: 4000. Un complesso polimerico (SuperPicture kit perossidasi, Zymed® Lab, San Francisco, USA) streptavidina-biotina-perossidasi è stato utilizzato per visualizzare l'interazione antigene-anticorpo e applicato sulle sezioni per 10 minuti a temperatura ambiente. La reazione immunoistochimica è stata sviluppata con una soluzione 3,3 'diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO). Le sezioni sono state poi sottoposte a colorazione di contrasto con ematossilina, disidratate con alcool e xilene prima del montaggio. Il metodo TUNEL (dUTP nick Terminal deossinucleotidil transferasi) è stato utilizzato per rilevare il tasso di apoptosi degli enterociti mediante il kit ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit

(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Le sezioni sono state deparaffinate per 30 min in Solvent plus (Carlo Erba Reagenti Srl, Italia) e idratate in una serie graduata di alcoli. Successivamente è stato eseguito il trattamento con proteinasi K (20 mcg / ml) in PBS per 15 min e a seguire l'attività perossidasi endogena è stata bloccata con 3% di perossido di idrogeno in acqua distillata per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio, le sezioni sono state sottoposte allo stesso protocollo usato per l'anticorpo anti-PCNA. Per ciascun tratto intestinale e ciascun marker (PCNA e TUNEL), sono state acquisite cinque fotografie microscopiche ad ingrandimento 20X, con una fotocamera digitale Nikon Sight SD-MS (Nikon Corporation, Giappone) collegata ad un microscopio ottico (jpeg, 2560 × 1920 pixel, RGB, 24 bit). Le immagini sono state preprocessate con il software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA) poi elaborate ed analizzate utilizzando il software ImageJ 1.46 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

La quantificazione della frazione di nuclei degli enterociti PCNA-positivi è stata effettuata con il plugin color segmentation di Imagej. (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/index.html#segmentation>) applicato su immagini preprocessate con Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA). La segmentazione consiste nel partizionamento di una immagine in regioni omogenee sulla base di un certo criterio di appartenenza dei pixel ad una regione omogenea (Lucchese e Mitra, 2001). L'immagine originale è stata segmentata in colori selezionati manualmente dall'operatore come nuclei DAB positivi, nuclei negativi colorati con ematossilina, citoplasma degli enterociti, e lo sfondo bianco. Il plugin calcola automaticamente la percentuale di area occupata da ciascun colore scelto e, in particolare, la percentuale di area occupata da nuclei PCNA-positivi. Al fine di eliminare false positività delle cellule non epiteliali (eritrociti, macrofagi, linfociti e fibroblasti), la lamina propria era stata eliminata manualmente utilizzando il software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA). La quantificazione della frazione di nuclei degli enterociti TUNEL-positivi, è stata effettuata adottando i seguenti criteri istologici quali indicatori di cellule in apoptosi (Kerr et al., 1972; Labat-Moleur et al., 1998): (a) evidenziazione di cromatina condensata (cellule in apoptosi); (b) frammenti citoplasmatici con o senza cromatina condensata (corpi apoptotici) e (c) cromatina intra ed extracellulare (micronuclei apoptotici). Le cellule TUNEL-positive sono state contate manualmente per eliminare i segnali aspecifici causati dall'applicazione di questo metodo su sezioni intestinali (Walker e Quirke, 2001; Ferrando *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006; Vyas *et al.*, 2007). E' stato in seguito utilizzato il plugin color segmentation di Imagej per calcolare la percentuale di area occupata dagli altri colori (nuclei negativi colorati dall'ematossilina, citoplasma degli enterociti, sfondo bianco). Dai dati ottenuti sono stati calcolati gli indici attraverso le seguenti equazioni:

$$PCNA\ index\ \% = \frac{\% \text{ area nuclei positivi PCNA}}{\% \text{ area nuclei positivi PCNA} + \% \text{ area nuclei negativi}} \times 100$$

$$Apoptotic\ index = \frac{\text{nuclei apoptotici/corpi apoptotici}}{\text{numero di nuclei negativi} + \text{nuclei apoptotici/corpi apoptotici}}$$

$$N^{\circ} \text{ nuclei negativi campo } 20x = \frac{\text{area del campo } 20x \times \% \text{ nuclei negativi}}{\text{area media di un nucleo}}$$

Dimensione frattale

La dimensione frattale (FD) è stata calcolata acquisendo fotografie di 80 segmenti intestinali (sezioni colorate con ematossilina eosina) ad ingrandimento 4× con una fotocamera Nikon Digital Sight SD-MS collegata ad un microscopio ottico (2560×1920 pixels; 24 bit; TIF). Le immagini codificate sono state processate con ImageJ 1.46: brevemente, dopo segmentazione è stato estratto il profilo della mucosa luminale (2560×1920 pixels; 8 bit; Gif). Successivamente è stata calcolata la dimensione frattale Box Counting impostando le seguenti boxes: 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, e 2048 pixel.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati ed elaborati con il software Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma). La distribuzione dei dati è stata analizzata per la normalità con lo Shapiro-Wilk test. Se i criteri di normalità erano soddisfatti, è stato condotto un test ANOVA ad una via con test post-hoc Fisher LSD; se i criteri di normalità non erano soddisfatti, si è proceduto ad un test Kruskal-Wallis con confronti multipli. Per ciascun indicatore di turnover (PCNA index ed Apoptotic index) è stata costruita una retta di regressione ponendo la FD come variabile dipendente e l'indicatore studiato come variabile indipendente (variabile esplicativa o regressore). La significatività è stata posta con $p < 0,05$.

Risultati

I tratti intestinali esaminati si mostravano nei limiti della norma all'esame istopatologico. L'immunocolorazione con anticorpo anti-PCNA mostrava un segnale nucleare intenso bruno omogeneo principalmente a carico degli enterociti del segmento basale delle pieghe intestinali (figura 1a). Il segnale TUNEL era rappresentato da un colore bruno intenso di sparsi e rari frammenti nucleari

e corpi apoptotici (figura 1b). Il PCNA index non era distribuito normalmente ($n = 108$; SW $W = 0,96290$; $p = 0,00418$). Esso mostrava inoltre un decremento significativo all'aumentare nella dieta della percentuale di MM ($n = 108$; $H = 13,64672$; $p = 0,0034$). Non si evidenziava differenza di PCNA index tra i tratti intestinali ($n = 108$; $H = 4,298455$; $p = 0,1166$). L'apoptotic index non era distribuito normalmente ($n = 108$; SW $W = 0,45922$; $p = 0,00000$) e non mostrava differenza tra le varie diete ($n = 108$; $H = 3,037620$; $p = 0,3859$). Considerando il tratto intestinale, tale indice era significativamente più alto nel segmento posteriore, se confrontato con il segmento anteriore ed intermedio ($n = 108$; $H = 21,21437$; $p = 0,0000$).

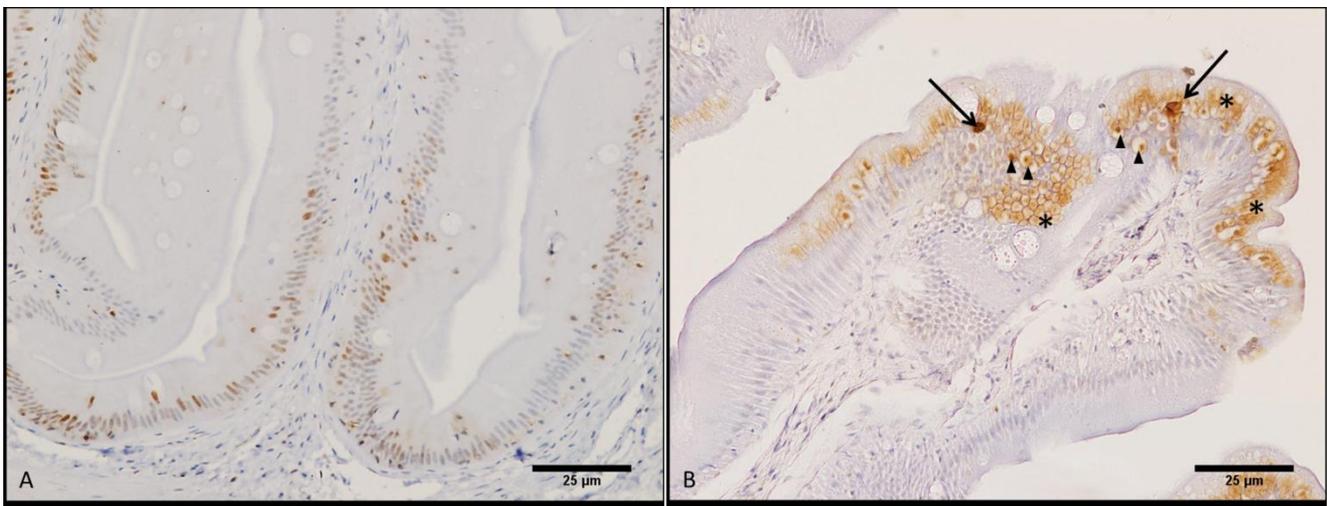


Figura 1: (A) Immunoistochimica anti PCNA, si noti la localizzazione dei segnali nucleari a livello della base delle pieghe. (B) cellule apoptotiche positive alla TUNEL (freccie) e corpi apoptotici (teste di freccia) sono principalmente a livello apicale nelle pieghe intestinali L'asterisco evidenzia la colorazione citoplasmatica non indicativa di apoptosi (Riferimento metrico = 25 μ m)

I valori della dimensione frattale mostravano distribuzione normale ($n = 80$; ShapiroWilk $W = 0,97847$; $p = 0,19599$) e un decremento significativo all'aumentare della percentuale di MM nella dieta ($n = 80$; $F(3,76) = 3,9997$; $p = 0,01063$) (tabella 1; tabella 2). Non si evidenziavano differenze significative tra i tratti intestinali ($n = 80$; current effect: $F(2,77) = 1,3182$; $p = 0,27359$). L'analisi della regressione lineare tra l'apoptotic index (variabile indipendente) e la FD (variabile dipendente), mostrava una significativa relazione inversa ($Beta = -0,337225$; $p = 0,002528$). L'analisi della regressione lineare tra PCNA index (variabile indipendente) ed FD (variabile dipendente), non evidenziava significatività ($Beta = 0,164612$; $p = 0,131582$).

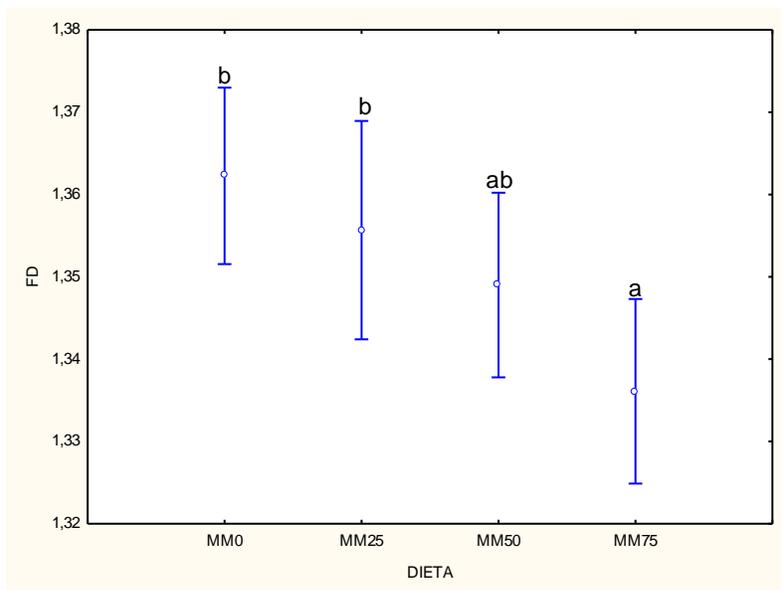


Figura 2: Effetto della dieta sulla dimensione frattale dell'intestino. Dati aggregati FD (rispettivamente, MM0 = 8 tratti intestinali anteriori + 7 intermedi + 8 posteriori = 23; MM25 = 4 tratti intestinali anteriori + 5 intermedi + 6 posteriori = 15; MM 50 = 6 tratti intestinali anteriori + 8 intermedi + 7 posteriori = 21 ed infine MM75 = 6 tratti intestinali anteriori + 8 intermedi + 7 posteriori = 21) Si evidenzia una progressiva riduzione di FD con l'aumento della farina di mitili (Anova Post hoc Fisher LSD test n = 80; media ± 1,96*SE, significatività p < 0,05) (le lettere indicano differenze significative nel confronto a coppie).

	Tratto anteriore	Tratto intermedio	Tratto posteriore
Istologia			
Outline			
FD	1,31	1,30	1,29

Tabella 1: esempio di foto originale, foto processata per l'estrazione dell'outline ed FD ricavata dall'outline, dieta MM75. L'aspetto istologico risulta nei limiti della norma.

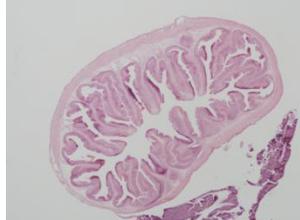
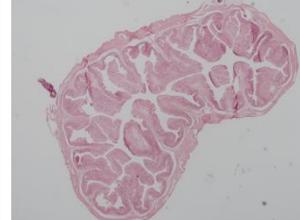
	Tratto anteriore	Tratto intermedio	Tratto posteriore
Istologia			
Outline			
FD	1,38	1,38	1,38

Tabella 2: esempio di foto originale, foto processata per l'estrazione dell'outline ed FD ricavata dall'outline, dieta MM0. L'aspetto istologico risulta nei limiti della norma.

Discussione

La prima importante considerazione che deriva da questo studio è che nessun trattamento dietetico induceva quadri degenerativi od infiammatori a carico dei segmenti intestinali osservati. Dunque la MM può essere considerata un valido sostituto della farina di pesce nella dieta della Solea. La valutazione istopatologica dell'apparato gastroenterico dei teleostei in campo acquacolturale vuole monitorare con finalità preventiva le manifestazioni adattative o le derive patologiche che potenzialmente possono essere indotte dagli stress nutrizionali-manageriali. Il target principale è l'identificazione del "punto di rottura" del management che esita con una incapacità adattativa dell'apparato esaminato.

La metodica immunoistochimica che utilizza l'anticorpo anti-PCNA ed il metodo TUNEL per quantificare il turnover degli enterociti sono utilizzati ampiamente in varie specie di pesci, in prove prettamente zootecniche, o in contesti eco-tossicologici (Ferrando *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006; Muncan *et al.*, 2007; Olsvik *et al.*, 2007; Ostaszewska *et al.*, 2008; Sanden *et al.*, 2009; Ostaszewska *et al.*, 2010; Ostaszewska *et al.*, 2011; Pohlenz *et al.*, 2012). La metodica TUNEL evidenzia intrinsecamente un labelling aspecifico, il quale non è un background, bensì una manifestazione di un legame aspecifico con frammenti di DNA prodotti dalle endonucleasi citoplasmatiche o dalle tecniche

di smascheramento dell'antigene (Stähelin et al., 1998; Wolvekamp *et al.*, 1998; Gál *et al.*, 2001; Walker e Quirke, 2001; Vyas *et al.*, 2007).

In questo studio il labelling TUNEL non specifico era citoplasmatico, da granulare a diffuso con talvolta segnale di membrana. Nonostante questa apparente limitazione, l'utilizzo del metodo TUNEL e dell'osservazione di preparati istologici in ematossilina eosina, alla luce dei criteri istomorfologici sopra descritti, ha consentito di identificare univocamente le cellule apoptotiche (Vyas *et al.*, 2007).

Il PCNA index mostrava un decremento progressivo all'aumentare dell'inclusione della dieta di MM, ovvero il tasso di proliferazione degli enterociti mostrava una risposta adattativa iperplastica progressiva con la deviazione della dieta dalla dieta naturale tipica della sogliola, organismo bentonico. L'indice apoptotico, che è la frazione di enterociti che vanno incontro a morte, non era influenzato dalla dieta, ciò può derivare dal fatto che la dieta modificata non è uno stimolo sufficiente al pari di stimoli ormonali o xenobiotici (Ferrando *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006).

Lo studio della regressione ha rivelato una relazione inversa significativa tra FD e Apoptotic index, ed un trend di relazione diretta, non significativa tra FD e PCNA index, ciò fa ipotizzare come la FD sia legata ed influenzata da tali indicatori (variabili esplicative), e rappresenti uno strumento di valutazione della complessità della mucosa intestinale della Solea. Alla luce del fatto che la FD è determinata dalla complessità della forma delle pieghe intestinali e fornisce informazioni strutturali, essa aggiunge al PCNA index ed all'Apoptotic index, misurati a livello di pieghe ed apice delle pieghe, la "conseguenza" strutturale del turnover degli enterociti. I frattali possono essere pensati in modo molto simile a quello con cui la termodinamica guarda misure intensive come la temperatura (grandezza che non dipende dalle dimensioni del campione) (Smith *et al.*, 1996); quindi, i cambiamenti di forma potrebbero essere considerati come "transizioni di fase", procedendo attraverso stati qualitativamente e quantitativamente diversi ma stabili. In altre parole, la FD può essere considerata una proprietà di sistema, e insieme con una o più variabili indipendenti, può tracciare un diagramma delle transizioni di fase volte a descrivere l'evoluzione di un sistema vivente (Huang e Ingber, 2007; Chang *et al.*, 2008; Bizzarri *et al.*, 2013). Alla luce di queste considerazioni, le "transizioni di fase" nel presente trial sono i valori crescenti di FD come risposta all'incremento di farina di mitili nella dieta. È noto come la dimensione frattale aumenti (nel range di valori da 1 a 2), coerentemente con la complessità dell'oggetto bidimensionale misurato, e nel presente studio l'integrazione statistica e concettuale dei tre parametri adottati porta ad ipotizzare come vi sia una risposta adattativa iperplastica, con aumento di complessità, negli intestini dei soggetti ad alimentazione sostituita progressivamente, e viene esibita inoltre una transizione da una dieta non sostituita (MM=0) ad una totalmente sostituita (MM75)

attraverso due livelli o “fasi” intermedie di complessità. L’adattamento morfo-funzionale iperplastico, diverso da quello fisiologico basale, può rappresentare un tentativo frustrato di aumentare l’interfaccia mucosale con una dieta progressivamente non naturale. Generalmente l’iperplasia vuole fare fronte a mutate condizioni e richiede più risorse ed una resa o efficienza inferiore del tessuto. Si tratta ancora di un fenomeno reversibile, ma rappresenta un trend di progressivo adattamento, evidenziato come aumento di proliferazione enterocitaria attraverso la tecnica immunohistochimica, in assenza di eventi degenerativi o infiammatori rilevabili con l’esame istologico. Inoltre, i risultati evidenziano una relazione tra diminuita proliferazione degli enterociti e minor complessità delle pieghe mucosali, espressa come una inferiore FD, nelle diete a contenuto crescente di MM. L’interpretazione biologica di questo fenomeno ribadisce e rafforza la presenza di un adattamento iperplastico intestinale a seguito della somministrazione di diete non naturali. Si sottolinea che il calcolo della FD potrebbe essere un utile e valido sostituto alle tecniche immunohistochimiche per la quantificazione del trofismo intestinale nei teleostei; il calcolo della FD infatti richiede un preparato istologico routinario, riducendo i costi in termini di tempo e reagenti. La FD è in grado di tradurre la complessità di una forma geometrica in un dato quantitativo continuo oggettivo, armonizzando il gap tra peculiarità strutturali (tipicamente qualitative) e misure funzionali quantitative. La teoria frattale viene ampiamente utilizzata in molti campi, dalla fisica alle applicazioni biomediche. La FD di un preparato istologico può essere vista come una istantanea di un processo in evoluzione, aumenta con la complessità dell’oggetto misurato (Losa e Nonnenmacher, 1996; Landini, 2011). Il valore della dimensione frattale è compreso tra 1 e 2 (Dey, 2005; de Arruda *et al.*, 2013). La FD estrae, misura e descrive quantitativamente come un oggetto riempie lo spazio in un determinato range di scala spaziale; è un eccellente strumento per la misura di forme complesse, irregolari che sono caratterizzate dall’autosimilarità (Tambasco *et al.*, 2009). Il presente trial rappresenta la prima prova sperimentale che utilizza la dimensione frattale per la determinazione del trofismo intestinale dei teleostei, integrando metodiche istologiche ed immunohistochimiche, e tale tecnica può essere proposta dal punto di vista procedurale come strumento di valutazione istologica quantitativa dei fenomeni adattativi intestinali, affiancando l’esame istologico od altre metodologie. Si evidenzia nuovamente come le metodiche di calcolo della cinetica degli enterociti e il calcolo della FD hanno fornito uno scenario coerente con una risposta adattativa iperplastica intestinale, in assenza di evidenze degenerative od infiammatorie evidenziate con l’esame istologico.

Seconda Sezione

La seconda sezione del presente capitolo è basata sulla pubblicazione:

Bianco C, Sirri R, Sarli G, Ostanello F, Bonaldo A, De Vico G, Luciana Mandrioli L How severe is the lipid accumulation in fish liver? A fractal answer. *The Fractal Laboratory Journal* 2013; 2:3

Gli oggetti ed i processi naturali mostrano un comportamento complesso, irregolare e frattale. La dimensione frattale (FD) è in grado di tradurre la complessità delle forme in dati quantitativi analitici, armonizzando il divario tra le caratteristiche strutturali (tipicamente qualitative) e le misure quantitative funzionali (Kenkel e Walker, 1996; Landini, 2011). La teoria dei frattali è stata ampiamente utilizzata in fisica, biologia ed in campo medico (Losa e Nonnenmacher, 1996; Cross, 1997) e in particolare in istologia e istopatologia per valutare il grado di complessità morfologica dei neuroni (Jelinek e Fernandez, 1998; Isaeva *et al.*, 2004) e per indagare la forma irregolare di neoplasie in relazione con la prognosi (Baish e Jain, 2001; Tambasco *et al.*, 2010; De Vico *et al.*, 2011; Landini, 2011). Il valore di FD aumenta con la complessità dell'oggetto. Le forme euclidee hanno FD pari ad 1, mentre un oggetto frattale rivela valori di FD compresi tra 1 e 2 (Dey, 2005). Per quanto riguarda l'istopatologia epatica, il calcolo della FD è stato applicato per la valutazione della fibrosi (Moal *et al.*, 2002; Grizzi *et al.*, 2006). In trial focalizzati sulla caratterizzazione della steatosi epatica, al contrario, l'analisi di immagine digitale è stata proposta come metodo affidabile per quantificare il contenuto epatico di lipidi (Levene *et al.*, 2005; El-Badry *et al.*, 2009). Nei pesci il fegato rappresenta la fonte principale di accumulo di lipidi: rispetto ai mammiferi gli epatociti dei pesci tendono ad essere più vacuolizzati, manifestazione istologica di un maggior contenuto di glicogeno e/o lipidi. Tale vacuolizzazione, che tende ad essere uniformemente distribuita, è spesso particolarmente evidente nel fegato dei pesci allevati (Penrith *et al.*, 1994; Wolf e Wolfe, 2005). Alcuni sistemi di scoring sono stati adottati per una valutazione oggettiva dei cambiamenti istologici epatici nei pesci (Pierce *et al.*, 1978; van Dyk *et al.*, 2007), soprattutto legati all'accumulo di lipidi (Mandrioli *et al.*, 2012). La tessitura istologica del parenchima epatico si modifica progressivamente con l'incremento dell'accumulo lipidico, acquisendo via via un aspetto a rete irregolare, quando gli epatociti assumono la forma “ad anello con castone” (citoplasma otticamente vuoto, aumento di volume epatocitario e nucleo sospinto alla periferia). Gli

obiettivi del presente studio sono: 1- valutare l'FD in corso di accumulo di lipidi nelle sezioni istologiche di fegato di *Solea senegalensis*; 2- confrontare l'FD con i valori ottenuti attraverso la segmentazione dell'immagine istopatologica e lo scoring istologico 3- discutere il significato funzionale del pattern frattale di accumulo di lipidi.

Metodi

Sono state esaminate sezioni istologiche (colorate con ematossilina ed eosina) di fegato ottenute da 36 *Solea senegalensis*; è stato stabilito uno scoring valutando 10 campi microscopici non adiacenti, ad ingrandimento 40X. Lo scoring adottato è stato descritto da Gatta *et al.* (2011) e Mandrioli *et al.*, (2012). L'accumulo lipidico è stato definito lieve (gravità=2), moderato (gravità=3) o grave (gravità=4) e tale gravità è stata definita in base alle seguenti caratteristiche istologiche: lieve se si evidenziavano numerosi piccoli vacuoli citoplasmatici otticamente vuoti; moderato se tali vacuoli otticamente vuoti citoplasmatici tendevano a spostare il nucleo verso la periferia; ed infine grave se tali vacuoli confluivano in un unico grande vacuolo che spostava il nucleo alla periferia. Quando i sopraelencati quadri istologici non erano presenti, il parenchima epatico è stato definito nei limiti della norma (scoring=1) (tabella 1). Sono state acquisite 5 immagini microscopiche di ciascun caso (obj 63x, TIFF format, 2088X1550 pixel) (totale 180 fotografie). Tali immagini sono state utilizzate per il trial descritto da Mandrioli *et al.*, (2012). Per la quantificazione dell'area interessata dall'accumulo di lipidi tramite analisi di immagine è stato utilizzato il software ImageJ 1.46 con il plugin color segmentation(<http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/colorsegmentation/>). Ogni immagine è stata segmentata manualmente e partizionata in due cluster di pixel, la zona interessata dall'accumulo lipidico e il restante campo microscopico, ed è stato ottenuto un valore rappresentato dalla percentuale di area occupata da lipidi (area otticamente vuota = empty area= EA) (tabella1). Per determinare la FD le stesse immagini sono state elaborate come segue: le immagini sono state sottoposte ad un processo di segmentazione ed è stata estratta l'outline per ottenere il contorno delle goccioline lipidiche.. Il calcolo della FD è stato eseguito mediante il comando specifico di Imagej settando box di 2,3,4,6,8,12,16,32,64,128,256,512,1024,2048 pixel.

Statistica

I valori medi di EA ed FD per ciascun soggetto sono stati calcolati. Preliminarmente, il test di Kolmogorov–Smirnov è stato utilizzato per analizzare la distribuzione dei dati. E' stata poi costruita la curva Receiver Operating Characteristic curve (ROC) con lo scopo di identificare un cut off di EA ed

FD nei casi in cui lo scoring istologico ≥ 4 , rispetto ai casi con scoring 2 e 3 (considerati insieme). Ciò ha voluto valutare se i parametri morfometrici adottati sono in grado di discriminare l'accumulo lipidico grave da quello lieve e moderato. Lo scoring istologico è stato considerato il gold standard. I dati normalmente distribuiti sono stati analizzati con statistica parametrica (Pearson), i dati a distribuzione non normale sono stati correlati con correlazione per ranghi di Spearman. Tutte le procedure statistiche sono state effettuate con il software SPSS 19 (International Business Machines Corporation-NY.USA).

Risultati

Lo scoring istologico variava da 2 a 4. Nessun caso si mostrava nei limiti della norma (punteggio pari a 1). I valori di EA variavano da 34,02 ad 87,03%. I risultati di FD variavano da 1,47 a 1,63 (vedi Tabella 1 per i dettagli ed esempi di scoring). Una correlazione statisticamente significativa (coefficiente di correlazione di Pearson = 0,69; $p < 0,001$) è stata identificata tra EA e scoring istologico. Nessuna correlazione è stata individuata tra FD e EA (coefficiente di correlazione di Pearson = -0,04; $p = 0,79$). Lo scoring istologico inoltre non correlava con la FD (Spearman's rho = -0,027; $p = 0,875$). L'accumulo di lipidi variava da microvescicolare a macrovescicolare: maggiore FD (1,63) corrispondeva a piccole gocce lipidiche (accumulo lipidico microvescicolare) che conferiscono una consistenza frastagliata alla texture epatica, mentre la FD inferiore (1,45) caratterizzava gocce lipidiche più grandi (accumulo di lipidi macrovescicolare) (Tabella 2). Inoltre, la classe intermedia di accumulo di lipidi (punteggio = 3), che è stato predominante, mostrava valori variabili di FD. La curva ROC ha evidenziato una scarsa accuratezza della FD come parametro in grado di discriminare la gravità dell'accumulo lipidico (AUC=0,545), mentre l'AUC del EA si è mostrato preciso (AUC = 0,925). Al valore EA pari al 55%, la sensibilità e la specificità sono 93,8% e 85%, rispettivamente (Figura 1).

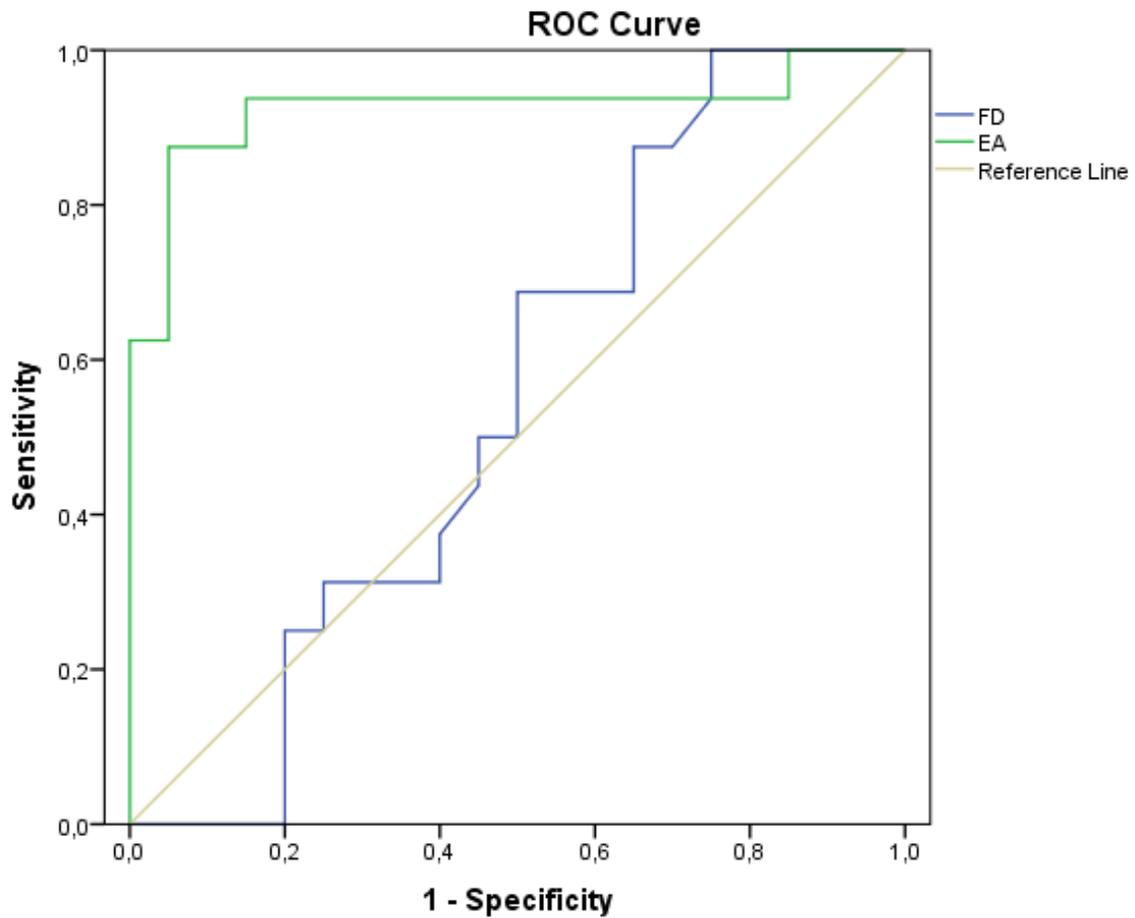


Figura 1: curva ROC che mostra comparativamente l'accuratezza dei due metodi (EA ed FD). Si apprezza la buona performance del metodo EA (AUC = 0,925; Se=93,8%; Sp=85%), e la scarsa accuratezza del metodo FD (AUC=0,545).

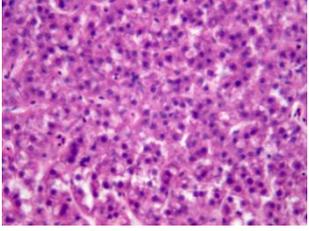
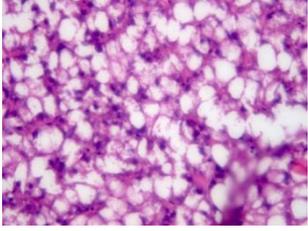
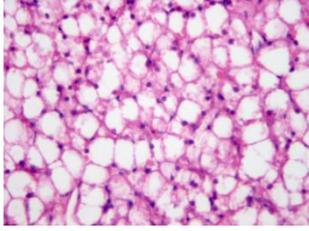
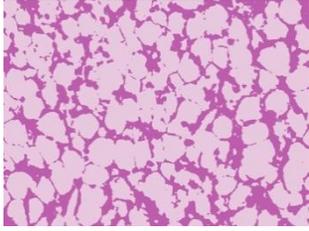
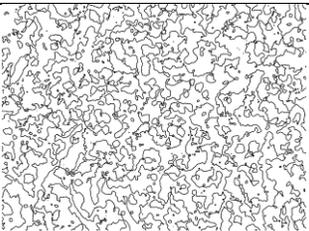
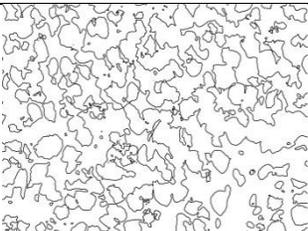
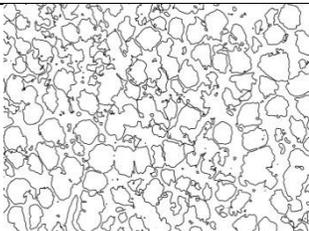
Istologia			
Immagine sottoposta a segmentazione			
Outline			
Score istologico	2	3	4
FD	1,64	1,54	1,57
EA (percentuale)	51,44%	53,94%	73,60%

Tabella 1: esempi di foto elaborate (immagine istologica, immagine segmentata, contorno, score istologico, FD e EA) rappresentative delle tre tre classi con scoring istologico crescente in termini di gravità

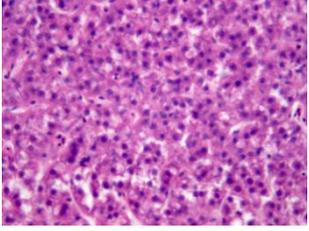
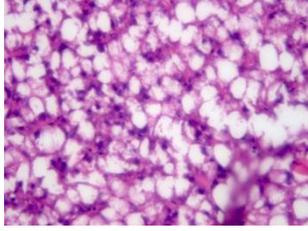
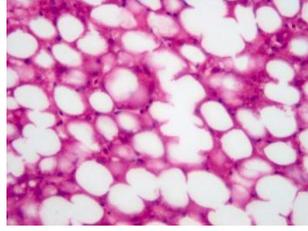
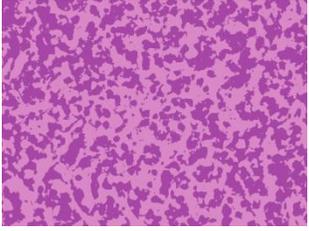
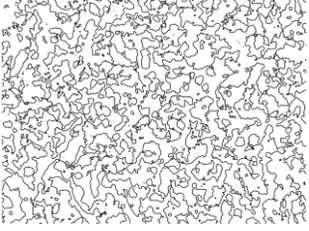
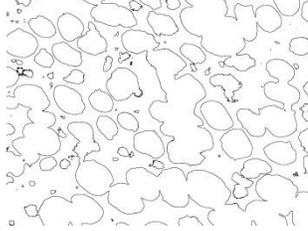
Istologia			
Immagine sottoposta a segmentazione			
Outline			
FD	1,64	1,54	1,45

Tabella 2: esempi di foto elaborate (immagine istologica, immagine segmentata, contorno, FD) rappresentative delle tre classi caratterizzate da tre pattern di accumulo lipidico dalla diversa texture e con FD decrescente.

Discussione

Nei teleostei il fegato non mostra la tipica architettura lobulare dei mammiferi. Le sezioni istologiche di parenchima epatico possono essere descritte come un monostato di cellule poliedriche organizzato in cordoni (muralium), senza un'architettura lobulare e con "diadi" sparse (un dotto biliare ed una vena o arteriola) (Evensen, 2006); di conseguenza il sistema standard per la classificazione dell'accumulo lipidico, codificato in patologia veterinaria, non può essere adottato.

In questo studio gli epatociti con un unico grande vacuolo lipidico che occupava l'intero citoplasma conferivano al parenchima epatico, istologicamente, una texture meno complessa, tendendo a bassi valori di FD. Questo fenomeno è legato al fatto che la forma euclidea rotonda di grandi gocce lipidiche è una forma che riduce al minimo l'interfaccia tra i trigliceridi e il citoplasma polare provocando una "perdita di frattalità". Il pattern di arrangiamento bidimensionale dei pixel determina la texture di un'immagine, concetto spesso nebuloso che può essere definito come una variazione spaziale di tono di un'immagine (Romero e Gonzalez, 2010), dal punto di vista statistico la texture è definita sulla base di due caratteristiche dei pixel: la variabilità e l'autocorrelazione spaziale. La caratteristica fondamentale

intrinseca della texture è un modello, pattern di ridotte dimensioni, che si ripete in modo periodico o quasi periodico in un'immagine. Tale texture può essere presente ad una determinata scala spaziale, e scomparire ad una scala maggiore o minore (Jähne, 2002). Si noti come il concetto di texture è una proprietà sinergica emergente dalla distribuzione spaziale dei pixel e dai mutui rapporti che tra essi intercorrono. I valori più elevati di FD possono essere interpretati come normale texture del parenchima epatico in istologia, giacché un lieve accumulo di lipidi può essere considerato fisiologico nei teleostei. Infatti, si presume che i processi biologici seguano modelli frattali, quindi una "perdita di frattalità" può essere considerato una deviazione da uno stato fisiologico ad uno patologico (Stadnitski, 2012). L'applicazione di questo concetto all'accumulo di lipidi nel fegato in *Solea senegalensis*, può essere interpretato come un fenomeno dinamico, fisiologico che sfocia in alcuni soggetti in una condizione patologica, caratterizzata da una inferiore FD. In questo studio lo scoring istologico non sembra essere determinato dal pattern macrovescicolare o microvescicolare di accumulo lipidico, ma dalla quantità di area interessata dal processo di accumulo.

L'adozione della curva ROC ha permesso di valutare e confrontare le performance e la precisione dei metodi di analisi d'immagine, nonché di identificare un valore di cut off. Più precisamente, il valore del 55% è stato fissato per discriminare un accumulo di lipidi grave da un accumulo lieve o moderato di lipidi; tale valore è stato scelto per l'alta sensibilità, precisione e specificità. Se dunque la metodica della segmentazione consente di quantificare la gravità del processo di accumulo, la FD può essere proposta come indicatore quantitativo del pattern di accumulo.

Infine seppure in patologia le tecniche istochimiche speciali (colorazione dei lipidi con Oil-Red-O) abbinate ad analisi d'immagine sono proposte come le tecniche più affidabili per la corretta quantificazione della quantità di lipidi epatici, si sottolinea che nel presente studio sono stati utilizzati preparati istologici di routine, senza il ricorso a colorazioni istochimiche per i lipidi.

Conclusioni

La FD qui presentata può essere utile per interpretare il pattern di accumulo lipidico nel parenchima epatico dei pesci piatti, anche se la misura della zona vuota coinvolta da accumulo di lipidi (EA) ha mostrato valori elevati di sensibilità e specificità rispetto al grado istologico che è considerato il gold standard. La segmentazione delle immagini istologiche di fegato di *Solea* fegato può essere proposta come strumento quantitativo di supporto allo scoring istologico, e la percentuale del 55% di EA può essere identificato come il cut off tra accumulo grave (oltre il 55%) e lieve-moderata (inferiore al 55%).

Bibliografia:

Baish JW, Jain RK (2000) Fractals and cancer. *Cancer Res.* 60: 3683-3688.

Bizzarri, Palombo A, Cucina A. (2013) Review: Theoretical aspects of Systems Biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 112: 33-43.

Cross SS (1997) Fractals in pathology. *J Pathol.* 182: 1-8.

Chang HH, Hemberg M, Barahona M, Ingber DE, Huang S. (2008) Transcriptome wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 453: 544-547.

de Aguilar-Nascimento JE. (2006) Evaluation of intestinal trophism: review of current methods and techniques. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 257–262.

De Vico G, Cataldi M, Maiolino P, Carella F, Beltraminelli S, Losa GA (2011) Fractal pattern of canine trichoblastoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 33: 151-157.

Dey P. (2005) Basic principles and applications of fractal geometry in pathology: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 27: 284–290.

El-Badry AM, Breitenstein S, Jochum W, Washington K, Paradis V, Rubbia-Brandt L, Puhan MA, Slankamenac K, Graf R, Clavien PA (2009) Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists: the end of a gold standard. *Ann Surg.* 250: 691-697.

Evensen Ø. Liver. In *Systemic Pathology of Fish*. 2nd edition. Edited by Ferguson HW. London: Scotian Press; 2006:201–216.

Ferrando S, Ferrando T, Girosi L, Mauceri A, Fasulo S, Tagliafierro G. (2005) Apoptosis, cell proliferation and serotonin immunoreactivity in gut of *Liza aurata* from natural heavy metal polluted environments: preliminary observations. *Eur J Histochem.* 49: 331–340.

Gál I, Varga T, Szilágyi I, Balázs M, Schlammadinger J, Szabó G Jr. (2000) Protease-elicited TUNEL positivity of non-apoptotic fixed cells. *J Histochem Cytochem.* 48: 963–970.

Gatta PP, Parma L, Guarniero I, Mandrioli L, Sirri R, Fontanillas R, Bonaldo A (2011) Growth, feed utilization and liver histology of juvenile common sole (*Solea solea* L.) fed isoenergetic diets with increasing protein levels. *Aquaculture Res.* 42: 313-321.

Grizzi F, Russo C, Franceschini B, Di Rocco M, Torri V, Morengi E, Fassati LR, Dioguardi N (2006) Sampling variability of computer-aided fractal-corrected measures of liver fibrosis in needle biopsyspecimens. *World J Gastroenterol* 12:7660-7665

Huang S, Ingber DE. (2000) Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp. Cell. Res.* 261, 91-103.

- Isaeva VV, Pushchina EV, Karetin Yu A. (2004) The quasi-fractal structure of fish brain neurons. *RussJ Mar Biol.* 30: 127-34.
- Jähne B. 2002 *Applications and Tools Digital Image Processing* 5th revised and extended edition, Springer
- Jelinek HF, Fernandez E. (1998) Neurons and fractals: how reliable and useful are calculations of fractal dimensions? *J Neurosci Methods.* 81:9–18.
- Kenkel NC, Walker DJ. (1996) Fractals in the biological sciences. *Coenoses*, 11: 77-100.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–257.
- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. (1998) TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 46:327–334.
- Landini G. (2011) Fractals in microscopy. *J Microsc.* 241:1-8.
- Levene AP, Kudo H, Armstrong MJ, Thursz MR, Gedroyc WM, Anstee QM, Goldin RD. (2012) Quantifying hepatic steatosis - more than meets the eye. *Histopathology.* 60: 971-981.
- Losa GA, Nonnenmacher TF. (1996) Self-similarity and fractal irregularity in pathologic tissues. *Mod Pathol* 9: 174–182.
- Lucchese L, Mitra S. (2001) Color image segmentation: A state-of-the-art survey. In *Proceedings of the Indian National Science Academy.*
- Lumsden JS. Gastrointestinal tract, swimbladder, pancreas and peritoneum. In *Systemic pathology of fish.* 2nd edition. London: Scotian Press: Ferguson HW; 2006: 64–89.
- Mandrioli L, Sirri R, Gatta PP, Morandi F, Sarli G, Parma L, Fontanillas R, Bonaldo A (2012) Histomorphologic hepatic features and growth performances of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed isogenetic practical diets with variable protein/lipid levels. *J App Ichthyol.* 28: 628-632.
- Moal F, Chappard D, Wang J, Vuillemin E, Michalak-Provost S, Rousselet MC, Oberti F, Calès P. (2002) Fractal dimension can distinguish models and pharmacologic changes in liver fibrosis in rats. *Hepatology.* 36: 840-849.
- Muncan V, Faro A, Haramis AP, Hurlstone AF, Wienholds E, van Es J, Korving J, Begthel H, Zivkovic D, Clevers H. (2007) T-cell factor 4 (Tcf7l2) maintains proliferative compartments in zebrafish intestine. *EMBO Rep.* 8: 966–973.

- Olsvik PA, Torstensen BE, Berntssen MHG. (2007) Effects of complete replacement of fish oil with plant oil on gastrointestinal cell death, proliferation and transcription of eight genes' encoding proteins responding to cellular stress in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Fish Biol.* 71: 550–568
- Ostaszewska T, Dabrowski K, Hliwa P, Gomółka P, Kwasek K. (2008) Nutritional regulation of intestine morphology in larval cyprinid fish, silver bream (*Vimba vimba*). *Aquacult Res.*39: 1268–1278.
- Ostaszewska T, Dabrowski K, Kamaszewski M, Grochowski P, Verri T, Rzepkowska M, Wolnicki J. (2010) The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp Biochem Physiol A.* 157:158–169.
- Ostaszewska T, Dabrowski K, Verri T, Kamaszewski M, Napora-Rutkowski Ł, Śliwiński J. (2011) The effect of various diet formulation (experimental and commercial) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine and liver morphology. *Aquacult Res.* 42: 1796–1806.
- Penrith ML, Bastianello SS, Penrith MJ. (1994) Hepatic lipoidosis and fatty infiltration of organs in a captive African stonefish, *Synanceja verrucosa* Bloch & Schneider. *J Fish Dis.* 17: 171–176.
- Pierce KW, McCain BB, Wellings SR (1978) Pathology of hepatomas and other liver abnormalities in English sole (*Parophrys vetulus*) from the Duwamish river estuary, Seattle, Washington. *J Natl Cancer Inst.* 60: 1445–1543.
- Rašković BS, Stanković MB, Marković ZZ, Poleksić VD. (2011) Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *J Agr Sci* 56: 87–100.
- Romero E, Gonzalez F. 2010 *Biomedical Image Analysis and Machine Learning Technologies: Applications and Techniques.* Medical Information Science Reference (IGI Global)
- Sanden M, Olsvik PA. (2009) Intestinal cellular localization of PCNA protein and CYP1A mRNA in Atlantic salmon *Salmo salar* L. exposed to a model toxicant. *BMC Physiol.* 9: 3.
- Smith TG, Lange GD, Marks WB. (1996) Fractal methods and results in cellular morphology and dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods* 69: 1.
- Stadnitski T. (2012) Measuring fractality. *Front Physiol.* 3: 127.
- Stähelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J. (1998) False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol Pathol.* 51: 204–208.
- Takahashi H, Takahashi A, Sakamoto T. (2006) In vivo effects of thyroid hormone, corticosteroids and prolactin on cell proliferation and apoptosis in the anterior intestine of the euryhaline mudskipper (*Periophthalmus modestus*). *Life Sci* 79: 1873–1880.

- Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM. (2009) Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron* 40: 486–494.
- Tambasco M, Eliasziw M, Magliocco AM. (2010) Morphologic complexity of epithelial architecture for predicting invasive breast cancer survival. *J Transl Med.* 31: 140.
- van Dyk JC, Pieterse GM, van Vuren JHJ. (2007) Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007, 66: 432–440.
- Vyas D, Robertson CM, Stromberg PE, Martin JR, Dunne WM, Houchen CW, Barrett TA, Ayala A, Perl M, Buchman TG, Coopersmith CM. (2007) Epithelial apoptosis in mechanistically distinct methods of injury in the murine small intestine. *Histol Histopathol* 22: 623–630.
- Walker JA, Quirke P. (2001) Viewing apoptosis through a 'TUNEL'. *J Pathol* 195: 275–276.
- Wolf JC, Wolfe MJ. (2005) A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol.* 33: 75-85.
- Wolvekamp MC, Darby IA, Fuller PJ. (1998) Cautionary note on the use of end-labelling DNA fragments for detection of apoptosis. *Pathology.* 30: 267–271.

Capitolo 4

Premessa

Il presente capitolo è basato sulla pubblicazione:

Bianco C, Felice V, Panarese S, Marrocco R, Ostanello F, Brunetti B, Muscatello LV, Leotti G, Vila T, Joisel F, Sarli G. Quantitative immunohistochemical assessment of IgA, IgM, IgG and antigen-specific immunoglobulin secreting plasma cells in pig small intestinal lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014; 160: 281-7.

Quantificazione attraverso immunoistochimica ed analisi d'immagine di plasmacellule secernenti IgA, IgM, IgG ed immunoglobuline anti Porcine Circovirus 2 (PCV-2) nella lamina propria dei tratti intestinale e genitale della specie suina: strumento di studio quantitativo dell'immunità mucosale.

Introduzione

I meccanismi di difesa innati aspecifici del tratto gastrointestinale includono le secrezioni gastriche e intestinali contenenti molecole antibatteriche, la presenza del muco, e la secrezione di citochine e chemochine. Il meccanismo di difesa intestinale che riceve più attenzione, tuttavia, è il sistema immunitario intestinale, che è caratterizzato dalla maggior concentrazione di anticorpi dell'organismo dei mammiferi.

La classificazione isto-funzionale del sistema immune riconosce diversi organi e tessuti: (Cormach, 1993; Day e Schultz, 2014): organi linfoidi concentrati capsulati (parzialmente o completamente=linfonodi, tonsille, milza, timo), concentrati non capsulati (aggregati linfoidi presenti in modo imponente a livello di mucose, la nomenclatura incorpora la localizzazione topografica), e diffusi non capsulati (cellule effettrici presenti in modo imponente a livello di mucose, la nomenclatura incorpora la localizzazione topografica). Tale classificazione consente di includere il tessuto diffuso non capsulato effettrice del Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT), rappresentato da plasmacellule e linfociti della lamina propria e da linfociti intraepiteliali (IEL) (Day e Schultz, 2014). La struttura, l'intelaiatura e l'impalcatura vascolo-stromale di tutti questi organi e tessuti linfoidi è specializzato e permette il coordinamento delle funzioni, riconosce componenti vascolari ematiche e linfatiche, e diverse sottopopolazioni di cellule mesenchimali stromali note come cellule stromali linfoidi (Stzepourginski *et al.*, 2015). Tale componente vascolo-stromale produce citochine e chemochine, presenta antigeni, induce tolleranza o risposte immunitarie, coordina il "trafficking"; in ultima analisi è parte attiva delle dinamiche immunitarie (Mueller e Germain, 2009). Si sottolinea che anche la lamina propria dell'apparato gastroenterico è contraddistinta dalla presenza di cellule stromali linfoidi, le quali espletano le funzioni poc'anzi citate (Powell *et al.*, 2011; Stzepourginski *et al.*, 2015).

L'organizzazione del sistema immunitario mucosale può essere diviso in: (a) siti induttivi e, (b) siti effettrici (Burkey *et al.*, 2009). I siti induttivi sono il sito dove si verifica l'uptake o assorbimento a livello di superficie della mucosa ed il priming dei linfociti B. Nei siti effettrici si verificano diversi fenomeni, tra cui la produzione di immunoglobuline A secretorie (SIgA) (Brandtzæg *et al.*, 2008). I

siti induttivi dell'immunità mucosale sono rappresentati dal mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) (Liebler-Tenorio e Pabst, 2006) e dai linfonodi locoregionali. I siti effettori, come ad esempio la lamina propria delle varie membrane mucose, non dovrebbero essere considerati parte del MALT (Brandtzæg *et al.*, 2008). L'organizzazione del sistema immune nella mucosa intestinale include il tessuto linfoide non capsulato concentrato (le placche di Peyer di ileo e digiuno) (Burkey *et al.*, 2009) che costituiscono i siti induttivi, includendo anche parte dell'epitelio associato con i follicoli (Sato e Iwasaki, 2005). Un tessuto linfoide diffuso non capsulato (linfociti, plasmacellule, macrofagi, cellule dendritiche, mastociti) situate al di fuori delle placche di Peyer, ma residenti nella lamina propria, rappresenta il sito effettore (Tizard, 2013). Le plasmacellule si trovano principalmente a livello di lamina propria a livello di cripte intestinali e costituiscono la componente secretoria del sistema immunitario mucosale, dedicata alla produzione di fattori umorali protettivi che agiscono sulla superficie della mucosa. La mucosa intestinale è esposta ed è a contatto con numerosi microorganismi patogeni o commensali, costituisce una prima linea di difesa, e rappresenta un target interessante per le vaccinazioni (Kim *et al.*, 2012). Alla luce di queste caratteristiche, è chiaro come l'immunità mucosale intestinale abbia suscitato molto interesse, soprattutto recentemente. La valutazione e lo studio dell'immunità mucosale è più complesso dello studio dell'immunità sistemica. Essa può essere investigata attraverso la quantificazione delle sottopopolazioni di cellule del sistema immune o mediante analisi delle molecole da queste prodotte (citochine, immunoglobuline). Non esiste un gold standard per valutare l'immunità secretoria in a livello di superfici mucose. La componente mucosale umorale può essere misurata e valutata con le stesse tecniche utilizzate per gli esami sierologici. Il campionamento delle secrezioni è critico, poiché può essere contaminato dal siero, o può subire diluizioni ad opera di altri contaminanti (ingesta o enzimi) (Guy, 2002). Inoltre il flushing intestinale o l'intestinal lavage non consentono un campionamento adeguatamente rappresentativo e quantitativamente sufficiente se le caratteristiche reologiche del film mucoso sono alterate (viscosità). In questi casi si può procedere con metodiche più aggressive dal punto di vista meccanico (brushing o scraping), ma tali tecniche potenzialmente aumentano la contaminazione ad opera del sangue o del siero. Il sistema immunitario intestinale è cruciale soprattutto nel caso di patologie a ciclo oro-fecale, quali le malattie causate da Circovirus suino (PCVD) (Rose *et al.*, 2012).

L'obiettivo del presente studio è lo sviluppo di una metodica immunoistochimica quantitativa in grado di evidenziare le plasmacellule produttrici anticorpi anti PCV2 in situ a livello di lamina propria intestinale.

Materiali e metodi

Casistica e campionamento

Da un precedente esperimento (Sarli *et al.*, 2012) erano disponibili campioni di duodeno, digiuno, ileo, di scrofe convenzionali Large White vaccinate (VI) con Circovac® o non vaccinate (NVI) e sperimentalmente infettate con seme contenente una sospensione di PCV2 (0.2 ml di PCV2b; sospensione contenente $10^{4.4}$ TCID₅₀/50µl). Per ogni gruppo (VI e NVI) erano disponibili i tessuti di 3 soggetti campionati a 28 e 53 giorni post-infezione (DPI); i soggetti campionati a 28 DPI erano non gravidi, mentre quelli sacrificati a 53 DPI erano gravidi.

Istologia ed immunistoichimica

I campioni di tessuto erano rappresentati da materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina da cui sono state tagliate al microtomo 5 sezioni seriali di 4 µm di spessore. Una sezione è stata colorata con ematossilina-eosina, 3 sezioni, rispettivamente, per l'indagine immunistoichimica con anticorpo anti-IgG, -IgA e -IgM di suino (Tabella 1). L'ultima è stata usata per la determinazione delle plasmacellule produttrici Ig specifiche per PCV2 sulla base di una tecnica proposta da Kipar *et al.* (1998). E' stato messo a punto un metodo "sandwich" che prevedeva il pretrattamento delle sezioni con una sospensione di PCV2 seguita, dopo lavaggio, da una reazione immunistoichimica diretta verso il virus per mezzo dell'anticorpo monoclonale F217 anti-PCV. Il virus in tale modo si poneva a ponte tra la plasmacellula secernente anticorpi specifici e l'anticorpo anti-PCVb aggiunto (Tabella 1).

Per la determinazione della specificità di reazione anti-IgG, -IgM ed -IgA è stato utilizzato, come controllo positivo, tessuto linfoide di suino normale mentre come controllo negativo l'anticorpo primario era sostituito da un altro di irrilevante specificità. Per la stessa finalità, nella reazione sandwich tesa ad identificare le PCs contenenti Ig specifiche per PCV2b, o veniva sostituito l'anticorpo primario con altro di irrilevante specificità o veniva omissa il passaggio di pretrattamento delle sezioni con la sospensione virale.

	IgG	IgM	IgA	PCV2 Ig
Blocking perossidasi endogene	3% H2O2 in metanolo per 30 min	3% H2O2 in metanolo per 30 min	3% H2O2 in metanolo per 30 min	3% H2O2 in methanol for 30 min
Antigen retrieval	Pronase E 0.05%; pH 7.5; 37°C; 7 min	Pronase E 0.05%; pH 7.5; 37°C; 7 min	Pronase E 0.05%; pH 7.5; 37°C; 7 min	Protease XIV 0.05%; 37°C; 15 min
Sospensione virale	-	-	-	10 ^{3.9} TCID ₅₀ /25 µl, diluizione 1:1, overnight a 5±3°C
preincubazione	PBS + 20% normal goat + 1% BSA	PBS + 20% normal goat + 1% BSA	Blocking reagent (Dako)	-
Anticorpo primario	Rabbit polyclonal anti-porcine IgG (Novus Biologicals Europe); 1:40000 in PBS + 20% normal goat serum; overnight a 5±3°C	Rabbit polyclonal anti-porcine IgM (Novus Biologicals Europe); 1:40000 in PBS + 20% normal goat serum; overnight a 5±3°C	Goat polyclonal anti-porcine IgA (Novus Biologicals Europe); 1:4000 in PBS + 1% BSA; overnight a 5±3°C	Anti-PCV2 monoclonal antibody (F217, fornito da G. Allan, Belfast, UK); 1:200 in PBS; 37°C per 2 hours
Sistema rivelatore	Polymeric system (Zymed® Lab)	Polymeric system (Zymed® Lab)	LSAB+ HRPSYSTEM(DAKO)	Polymeric system (Zymed® Lab)
Cromogeno	Diaminobenzidina 0.05%; 10 min temp ambiente	Diaminobenzidina 0.05%; 10 min temp ambiente	Diaminobenzidina 0.05%; 10 min temp ambiente	Diaminobenzidina 0.05%; 10 min temp ambiente
Controcolorazione	Papanicolaou ematossilina	Papanicolaou ematossilina	Papanicolaou ematossilina	Papanicolaou ematossilina

Tabella 1: protocollo immunoistochimico: specifiche anticorpo, diluizione, e antigen retrieval, per gli isotipi: IgG (a), IgM (b) e IgA (c) e il protocollo di immunoistochimica tecnica sandwich (d) per il rilevamento di plasmacellule secernenti anticorpi anti-PCV2.

Analisi quantitativa delle plasmacellule

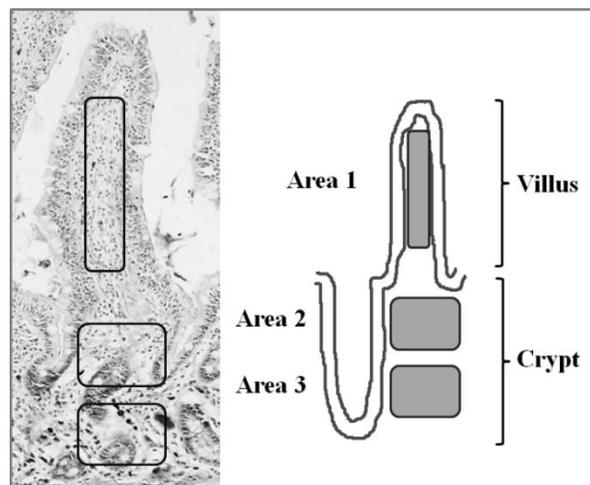


Figura 1: Sulla destra, le aree di riferimento proposti da Waly *et al.*, 2001. Sulla sinistra: aree anatomico-funzionali dell'intestino tenue: Area 1 (lamina propria della villo); Area 2 (lamina propria della parte superiore della cripta); Area 3 (lamina propria della parte profonda della cripta).

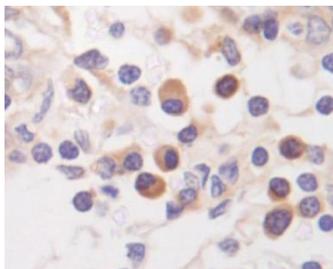
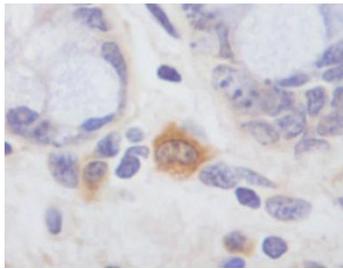
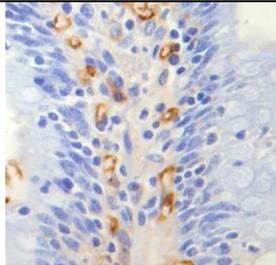
L'analisi quantitativa delle PCs è stata effettuata sui tre segmenti di piccolo intestino, ed è stata condotta secondo il metodo di Waly *et al.* (2001), valutando separatamente i conteggi eseguiti nei 3 strati o aree anatomico-funzionali della lamina propria intestinale: 1) lamina propria a livello del villo, 2) lamina propria a livello della parte superiore e 3) della parte inferiore della cripta (Figura 1). Per ogni area sono state acquisite da 3 a 6 immagini (fotocamera digitale Leica DFC320; microscopio Leica TM DMLB; JPEG, 2088×1550 pixel, Obj 40 \times) ed in ognuna la lamina propria è stata selezionata, e misurata la quantità di PCs contate. L'analisi di immagine è stata effettuata con software imagej (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). L'area minima di lamina propria misurata è stata pari a $4000 \mu^2$. La densità di PCs nella lamina propria è stata espressa come numero di PCs/10000 μ^2 di lamina propria.

Analisi statistica

La distribuzione dei dati è stata analizzata con test Kolmogorov–Smirnov, le varianze sono state analizzate con test di Levene. Un general linear model (GLM) per misure ripetute è stato utilizzato per analizzare le differenze tra VI ed NVI e gli effetti del momento di campionamento (29 DPI e 53 DPI), area di campionamento (a1, a2, etc.) e tratto intestinale. È stato utilizzato il software IBM SPSS v. 21.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), la significatività è stata posta a $p < 0,05$.

Risultati

L'esame istologico dei tessuti intestinali metteva in evidenza tessuti nei limiti della norma. I preparati immunohistochimici IgA, IgM ed IgG mostravano un pattern di immunolabelling cellulare ed extracellulare (Tabella 3). In particolare, tra i pattern di immunolabelling cellulare, si apprezzavano le plasmacellule, che mostravano un deciso, omogeneo o talvolta grossolanamente granulare immunolabelling citoplasmatico; la forma delle plasmacellule era ovale, con margini netti, nucleo paracentrale o eccentrico e sovente si apprezzava un accenno di pattern cromatinico "a ruota di carro".

Cellula o compartimento extracellulare	Staining pattern	Isotipo	
Plasmacellula	Diffuso staining bruno omogeneo citoplasmatico talvolta citoplasmatico grossolanamente granulare, cellula ovale con margini distinti con nucleo tondo eccentrico e spesso un pattern cromatinico "a ruota di carro"	IgA; IgM; IgG; IgS	 <p>Duodeno: a2, tecnica immunohistochimica sandwich 630x</p>
Macrofago	Grandi dimensioni, staining citoplasmatico bruno variabile, margini sfumati ed irregolari, nucleo centrale o paracentrale con forma ovale o indentata e pattern cromatinico disperso	IgS	 <p>Duodeno: a3 tecnica immunohistochimica sandwich 630x</p>
Cellule endoteliale	Diffuso ed intenso staining citoplasmatico di cellula appiattita e incospicua	IgA; IgM; IgG; IgS	 <p>Ileo; a1 IgM immunohistochimica 400x</p>

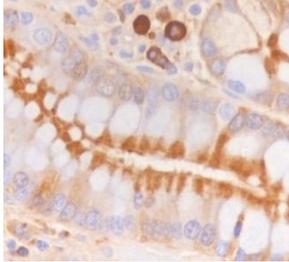
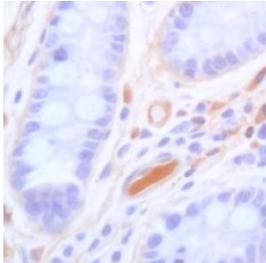
cellule caliciformi delle cripte	Localizzazione citoplasmatica apicale, staining da granulare ad irregolare	IgA; IgM; IgS	 <p>Ileo: a2; IgA immunohistochimica, 400X</p>
Lume vasi ematici e linfatici	Staining a “nubecola” o diffuso intravascolare	IgA; IgM; IgG; IgS	 <p>Digiuno: a2; IgG immunohistochimica 400x,</p>

Tabella 3: staining pattern, cellule o compartimenti extracellulari e foto relative

Si apprezzava un immunolabelling presente a livello citoplasmatico delle cellule endoteliali. Si identificava inoltre, nelle sezioni IgA ed IgM, un deciso staining apicale a carico delle cellule delle cripte. L’immunolabelling extracellulare si apprezzava a livello di matrice extracellulare della lamina propria e di lume di taluni vasi di piccolo calibro e di membrana basale endoteliale. La densità di PC contenenti IgA, IgG e IgM, considerate singolarmente, non ha evidenziato differenze tra aree, tratti e gruppi ed i dati sono stati usati in pool. Considerando la somma di tutti isotipi, la densità delle PC ha mostrato un aumento significativo ($p < 0.05$) dall’area 1 (villo) alla parte inferiore delle cripte ("gradiente verticale"). Nel duodeno le concentrazioni erano significativamente inferiori ($p < 0.05$) nella area 1 rispetto all'area 2 e 3, ma non vi erano differenze tra zona 2 e 3. Negli altri due tratti intestinali, la concentrazione è significativamente inferiore ($p < 0.05$) nell’area 1 rispetto all’area 2 e nell’area 2 rispetto nell'area 3. La sinossi dei valori è riportati nella Tabella 2.

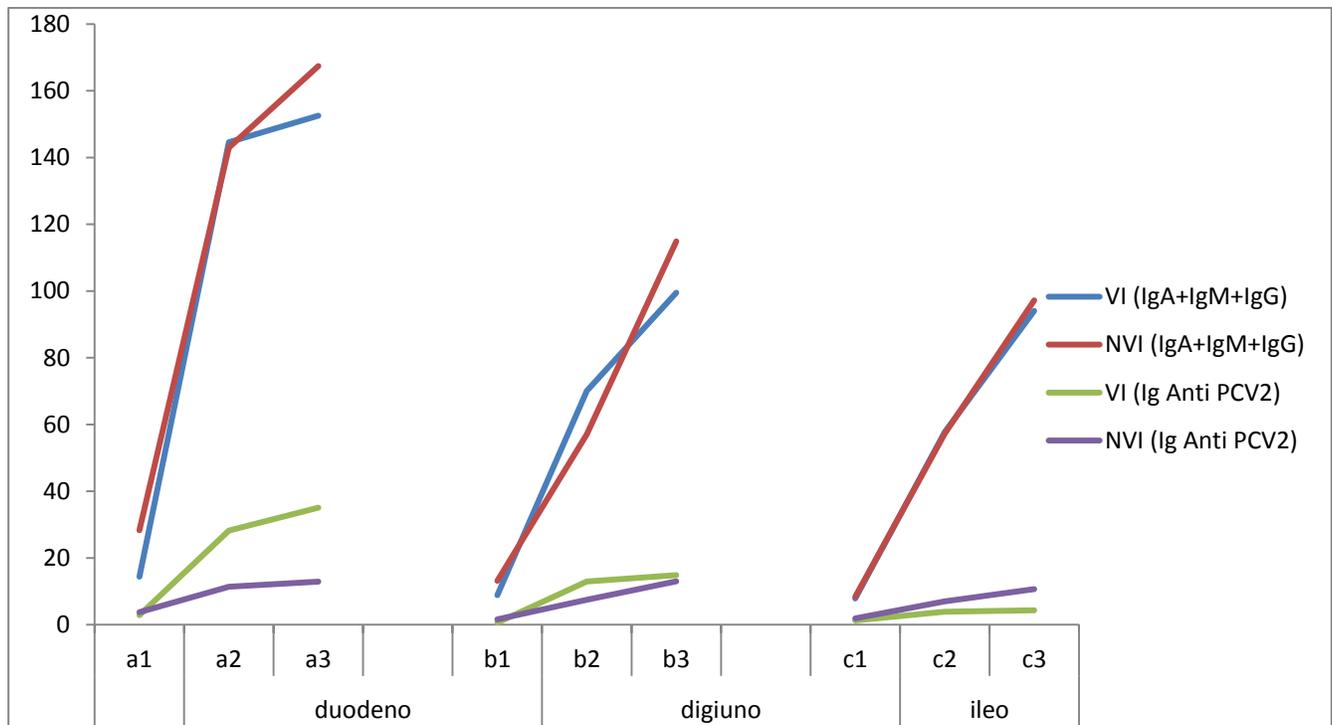


Figura 2: Densità delle plasmacellule a livello di lamina propria intestinale: gradiente orizzontale e verticale dei gruppi VI e NVI (IgA + IgM + IgG e anti-PCV2 plasma cell density/10,000 micron quadrati di lamina propria). Duodeno: a1 = lamina propria (lp) del villo; a2 = area di lp superficiale delle cripte ; a3 = lp profonda delle cripte; digiuno: b1 = lp del villo ; b2 = area di lp superficiale delle cripte; b3 = lp profonda delle cripte; ileo: c1 = lp del villo; c2 = area di lp superficiale delle cripte; c3 = lp profonda delle cripte.

La densità delle PC contenenti IgA, IgG e IgM, considerando la somma di tutti isotipi, non è stata influenzata dalla vaccinazione, dal tempo di campionamento, e dall'interazione tempo di campionamento e di vaccinazione ($p > 0,05$). Le PC produttrici di IgA sono state le più numerose, seguite dalle PC contenenti IgG e infine dalle IgM. La metodica immunocitochimica "sandwich" ha mostrato la presenza di immunolabelling cellulari ed extracellulari. Le plasmacellule secernenti anticorpi specifici sono state colorate.

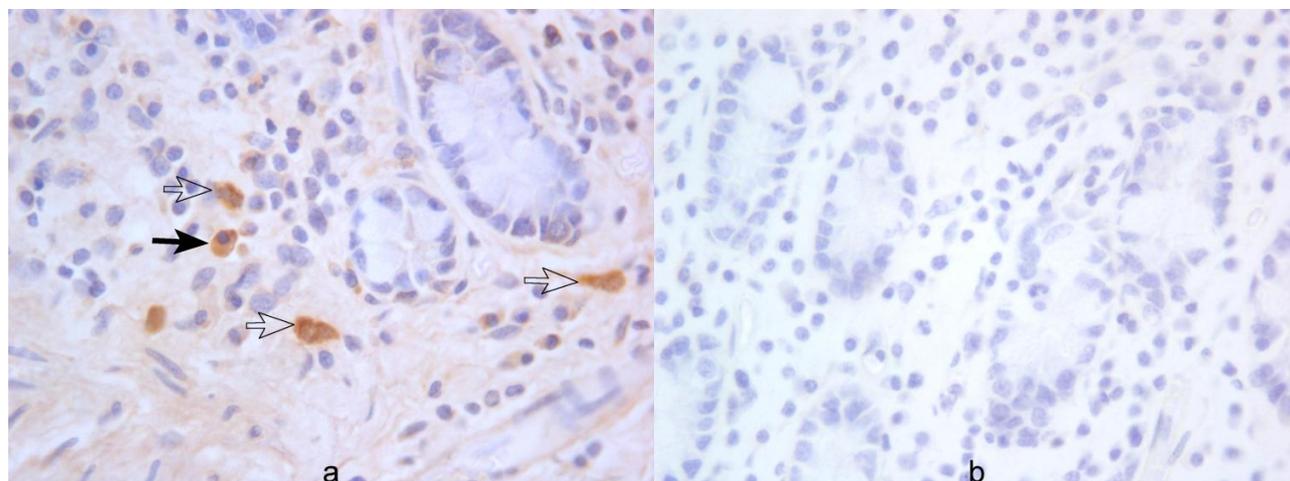


Figura 3 (a) duodeno: metodica sandwich anti-PCV2 IHC: la freccia piena indica una plasmacellula positiva, le frecce vuote indicano immunolabelling citoplasmatico di macrofagi-istiociti. (b) duodeno: controllo negativo l'omissione step di incubazione con sospensione virale. (Dab +ematossilina; Obj 63 ×).

Il segnale era assente quando è stata omessa la sospensione virale mancava o l'anticorpo primario (Fig. 3). Sono stati rivelati segnali a livello di macrofagi, comparto apicale delle cellule delle cripte, cellule endoteliali e matrice extracellulare. Le caratteristiche del segnale, il pattern di immunolabelling erano sovrapponibili a quanto già descritto.

tratto	Area	Densità PC VI				Densità PC NVI			
		Ig A	Ig G	Ig M	Anti-PCV2	Ig A	Ig G	Ig M	Anti-PCV2
Duodeno	a1	5.03±2.99	5.12±2.78	4.56±4.44	2.82±4.50	10.48±3.06	10.89±4.56	6.98±0.45	3.76±1.27
Duodeno	a2	56.01±24.85	27.42±14.38	40.37±13.95	28.19±10.98	64.19±21.20	47.71±16.62	31.07±5.49	11.40±4.81
Duodeno	a3	72.69±37.39	35.42±29.18	28.99±7.50	35.06±16.30	82.82±17.87	53.01±7.27	31.59±8.82	12.92±4.32
Digiuno	b1	3.98±2.82	3.36±0.77	2.50±1.53	0.59±1.16	4.50±1.53	4.55±2.14	4.07±2.46	1.62±0.67
Digiuno	b2	23.52±3.22	12.93±9.50	20.97±9.27	12.94±16.94	20.89±6.17	17.43±5.09	18.73±11.91	7.45±2.45
Digiuno	b3	42.36±20.58	26.63±14.76	23.13±10.36	14.84±12.74	58.78±19.09	30.76±13.43	25.35±12.86	12.98±5.78
Ileo	c1	3.43±1.86	3.76±1.81	2.27±1.28	1.28±1.02	2.69±1.49	2.67±1.02	3.00±0.99	1.89±0.40
Ileo	c2	23.19±9.89	8.67±5.46	18.04±8.64	3.89±3.53	25.74±11.10	19.65±13.60	11.87±2.56	6.99±4.79
Ileo	c3	37.06±21.25	16.40±4.74	29.22±13.39	4.34±3.64	45.65±17.22	30.83±14.15	20.72±8.61	10.65±2.07

Tabella 2. media ± DS delle plasmacellule secernenti IgA, IgG, IgM e anti-PCV2 (PC / 10000 μ²) delle singole aree anatomiche funzionali nei 2 gruppi di animali (VI=vaccinati infettati; NVI=non vaccinati infettati)

-a1, b1 e c1 indicano rispettivamente la zona 1 (lamina propria dei villi) nel duodeno, digiuno e ileo.

-a2, b2 e c2 indicano rispettivamente la zona 2 (lamina propria della parte superiore delle cripte) nel duodeno, digiuno e ileo.

-a3, b3 e c3 indicano rispettivamente la zona 3 (lamina propria della parte inferiore della cripta) nel duodeno, digiuno e ileo.

La densità delle plasmacellule specifiche per PCV2 ha mostrato i medesimi gradienti “orizzontale” e “verticale” già riscontrati e descritti per i singoli isotipi. La densità delle PC specifiche è apparsa significativamente ($p < 0,05$), influenzata dalla vaccinazione nel duodeno, ma non nel digiuno e nell’ileo; invece la densità non era influenzata dal momento del campionamento ($p > 0,05$). È stata osservata una diversa dinamica temporale delle Pc specifiche della lamina propria tra i gruppi VI ed NVI. Nel gruppo NVI, nessun aumento di PC era dimostrabile nel tempo: le densità delle PC specifiche a 29 e 53 DPI erano simili (rispettivamente: 10.55 ± 4.24 e 10.06 ± 5.01) e non erano statisticamente differenti ($t = 0,303$, $p = 0,76$). Al contrario, nel gruppo VI è stato osservato un aumento significativo di tale densità tra i due momenti di campionamento successivi da: 9.37 ± 13.36 a 29 DPI fino a 18.76 ± 15.83 a 53 DPI (M–W U = 71.00; $p = 0.037$).

Discussione

Il presente studio ha descritto e quantificato la densità e la distribuzione delle plasmacellule contenenti IgA, IgG e IgM ed anticorpi specifici anti-PCV2 nella lamina propria di segmenti di piccolo intestino di suini convenzionali. La distribuzione delle PCs nella mucosa intestinale lungo l’asse villo-cripta aumenta (gradiente verticale), mentre diminuisce, in senso prossimo-distale, dal duodeno all’ileo (gradiente orizzontale), e le Pc contenenti IgA sono predominanti. I nostri risultati confermano quantitativamente l’esistenza di pattern di distribuzione riportati da Allen e Porter (1973, 1977) e dimostrano la validità e la fattibilità del metodo come tecnica per studiare l’immunità mucosale secretoria. Dalla letteratura, emerge come le PC contenenti IgA e IgM sono più numerose delle PC secernenti IgG (Stokes e Bailey, 2000). La distribuzione delle PC non è uniforme lungo segmenti successivi dell’intestino (Allen e Porter, 1973): nella lamina propria duodenale, la densità delle PC è circa 10 volte superiore rispetto a quelle del digiuno indipendentemente dall’isotipo di immunoglobuline (Allen e Porter 1973, 1977). La distribuzione non è uniforme lungo l’asse villo-cripta: nei suinetti non svezzati, sia le PC contenenti IgA che IgM sono più numerose nella lamina propria a livello di cripte, rispetto ai villi (Allen e Porter, 1973). Questa funzione è coerente con la “fisiologica” concentrazione delle cellule IgA secernenti a questo livello: i linfociti a seguito del priming migrano a livello di lamina propria attorno alle cripte, come descritto da Bimczok e Rothkötter (2006), attraverso le numerose venule post-capillari qui presenti. Un’altra possibile spiegazione è legato al pattern di distribuzione del recettore immunoglobulina polimerica (Pigr) nell’intestino (Marsilio *et al.*, 2011). Da quanto sopra, si evince l’importanza di visualizzare l’esatta localizzazione istologica delle cellule immunitarie nella mucosa per poter confrontare situazioni

patologiche e non. Tra i risultati da enfatizzare, vi è la specificità e la ripetibilità della tecnica immunohistochimica sandwich, che fa uso di una sospensione virale al pari di un reagente. La specificità è stata dimostrata dall'assenza di colorazione con l'omissione dell'anticorpo primario o della sospensione virale. La presenza di staining dei macrofagi e di cellule stromali ed endoteliali può essere interpretato come una manifestazione dell'espressione citoplasmatica e membranaria di Toll like receptor (TLR) (Ackermann, 2012). Inoltre i macrofagi della specie suina contengono TLR-9 citoplasmatico e tale recettore mostra elevata affinità per segmenti di DNA CpG, sequenza altamente conservata tra i virus (Vincent *et al.*, 2007; Fairbairn *et al.*, 2011). I macrofagi del suino contengono anche il fattore del complemento C1qB, in grado di interagire con il capsido del PCV2 (Meng, 2013). Lo staining della porzione apicale delle cellule delle cripte può essere giustificato dalla elevata concentrazione di anticorpi in questa regione, come fase di transitosi che precede la secrezione delle IgA. Lo staining extracellulare ed intravascolare, parimenti può essere interpretato come una manifestazione di presenza di anticorpi anti PCV2 in ambito extracellulare. Sulla base della distinzione che si fa in sierologia tra anticorpi totali ed anticorpi neutralizzanti, nonché basandosi sull'evidenza che le proprietà immunomodulatrici del PCV2 esitano in pattern di risposta umorale sistemica diversi ed articolati (Trible *et al.*, 2011), si propone una interpretazione qualitativa, speculativa degli epitopi che più verosimilmente la metodica immunohistochimica "sandwich" ha rivelato. Si può inoltre ipotizzare che le plasmacellule secernenti anticorpi anti PCV2, siano produttrici di anticorpi orientati verso epitopi capsidici del virus, questo perché è stata addizionata una sospensione di virus, dove i virioni sono integri, e successivamente è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-PCV2. Dunque, la metodica potrebbe essere molto utile anche perché sarebbe in grado di dimostrare la presenza di plasmacellule secernenti anticorpi contro epitopi capsidici con una localizzazione mucosale e con estrema probabilità dunque proteggenti, dunque cioè potrebbe putativamente garantire una efficace clearance mucosale del patogeno. Le tecniche per quantificare le sottopopolazioni cellulari a livello di lamina propria sono numerose ed avanzate, ma nella stragrande maggioranza non conservative (Guy, 2002). Altri fattori confondenti di queste tecniche sono la contaminazione con siero o sangue, in grado di fornire sia cellule che fattori umorali. La carenza più importante di queste tecniche è che non possono rilevare la distribuzione spaziale della cellule nel tessuto in cui si trovano. Un'altra metodica per valutare la risposta immunitaria umorale mucosale è quello di testare i titoli di anticorpi nei flushing intestinali, mediante tecniche sierologiche. Tenendo conto della diversa affinità degli anticorpi ai componenti fluidi o viscosi delle secrezioni intestinali (Kim e Ho 2010), la sensibilità del test può essere fortemente compromessa dalla tecnica di campionamento. Dai risultati del trial in vivo da cui i tessuti

sono stati campionati,, gli animali (VI e NVI) avevano titoli sierologici simili e si era osservata una frequenza significativamente più bassa di eventi viremici e di magnitudine dello shedding nei vaccinati rispetto al non vaccinati (Sarli *et al.*, 2012). Alla luce di queste evidenze, dati ottenuti sono stati interpretati come una capacità, manifestata dai soggetti vaccinati, di modulare positivamente la densità di PC anti-PCV2 nella lamina propria dopo l'infezione (ottenuta mediante inseminazione con seme addizionato con PCV2b) (29 vs 53 giorni dall'infezione). Si ipotizza a questo riguardo una efficace trasduzione mucosale della stimolazione vaccinale parenterale nei soggetti vaccinati, che hanno manifestato un effetto “booster”. Le caratteristiche del metodo proposto, che affianca una tecnica immunoistochimica sandwich sviluppata ad hoc con l’analisi di immagine, produce un dato quantitativo che può trovare applicazioni in condizioni di normalità o in presenza di patologie, può essere proposto per indagare l’immunità umorale mucosale secretoria di altre mucose alla luce della odierna visione unitaria del sistema immune mucosale nel suino (Wilson e Obradovic, 2014); infine, essendo un dato quantitativo continuo, può essere confrontato e correlato con altri dati sieroepidemiologici (anticorpi sierici, viremia, shedding virale).

Addendum

Considerazioni sullo staining pattern extracellulare di anticorpi anti IgA, -IgG, IgM suino e sulla metodica sandwich: risultati qualitativi di staining dell'utero suino

Le stesse metodiche di rivelazione delle plasmcellule secernenti IgA, IgM, IgG ed immunoglobuline anti-PCV2 sono state impiegate su tratti degli apparati riproduttori (vagina, cervice e tre tratti uterini) degli stessi animali. Come già descritto, tre animali per ciascun gruppo erano gravidi, ed il campionamento ha incluso, oltre all'utero anche l'adiacente allantochorion (c.d. placenta). In primo luogo si descriverà e discuterà l'immunolabeling delle IgA, IgM ed IgG, per poi descrivere, interpretare e discutere il pattern di immunolabelling delle immunoglobuline antiPCV2 a livello di unità feto-placentare.

Risultati

A livello di utero gravido si sono apprezzati medesimi pattern di staining descritti nei tratti intestinali (rare plasmacellule, cellule endoteliali, talvolta porzioni apicali di ghiandole, lumi vascolari e linfatici, matrice extracellulare). Una notevole evidenza, come si evince dalla figura, è stato il marcato staining della matrice extracellulare, da amorfo a fibrillare, presente a livello di lamina propria dell'endometrio soprattutto dei preparati di unità feto-placentari allestiti con anticorpi anti IgA ed anti IgG, tale positività era tenue nei preparati anti IgM. Costantemente era presente una decisa negatività dello stroma allantocoriale (Figura 1).

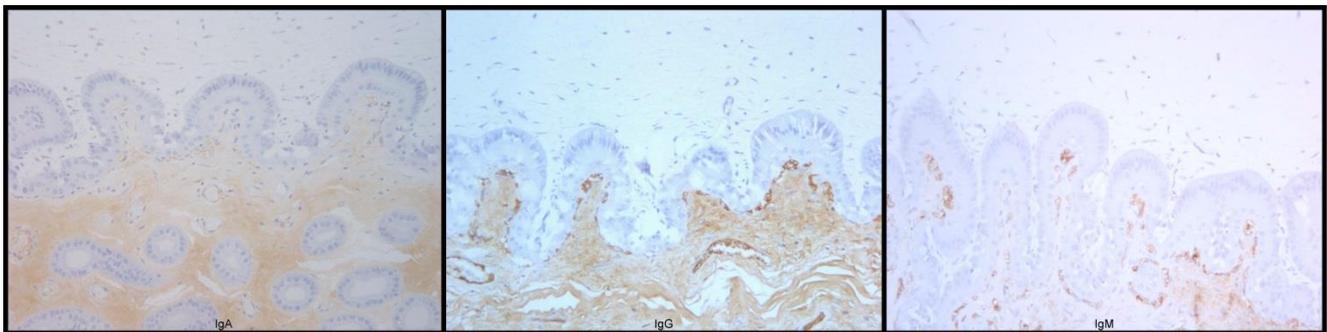


Figura 1: unità utero-placentare (in alto allantochorion, interdigitato con endometrio, in basso) esempio di staining pattern extracellulare della lamina propria (immunoistochimica anti IgA, IgG, IgM, obiettivo 20x).

L'applicazione della metodica sandwich per la ricerca delle plasmacellule secernenti immunoglobuline anti-PCV2 a livello di unità utero-placentari è stata efficace nell'identificare le poche plasmacellule presenti, ma sono state marcate altre cellule e strutture, tra cui: fibroblasti stromali (citoplasma) della lamina propria e dell'allantochorion, cellule endometriali, che esibivano a piccolo ingrandimento un disegno "festonato", lume di vasi linfo-ematici, matrice extracellulare con pattern fibrillare (Figura 2).

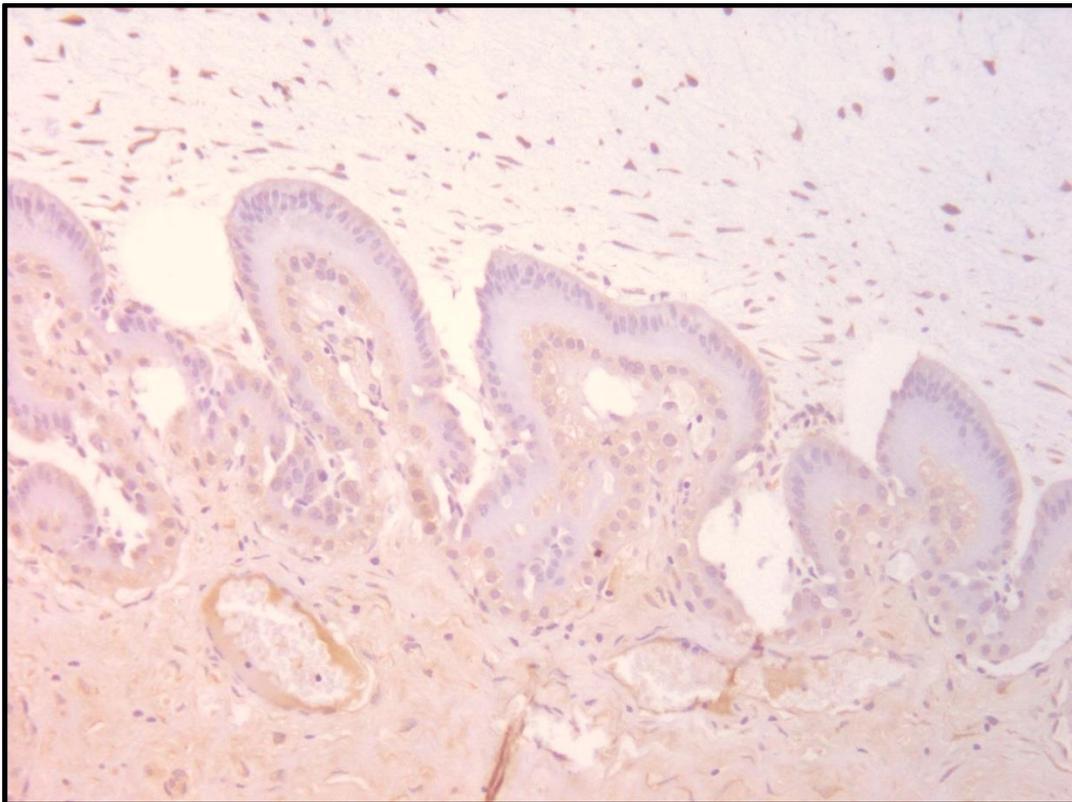


Figura 2: unità utero-placentare (in alto allantochorion, interdigitato con endometrio, in basso) esempio di staining pattern extracellulare della lamina propria (metodica sandwich anti PCV2, obiettivo 20x).

L'esame del preparato a cui era stato omesso l'anticorpo primario monoclonale antiPCV2 (controllo negativo) era caratterizzato da lieve pattern di immunolabelling fibrillare a livello di lamina propria endometriale, nessun tipo cellulare mostrava marcatura (Figura 3).

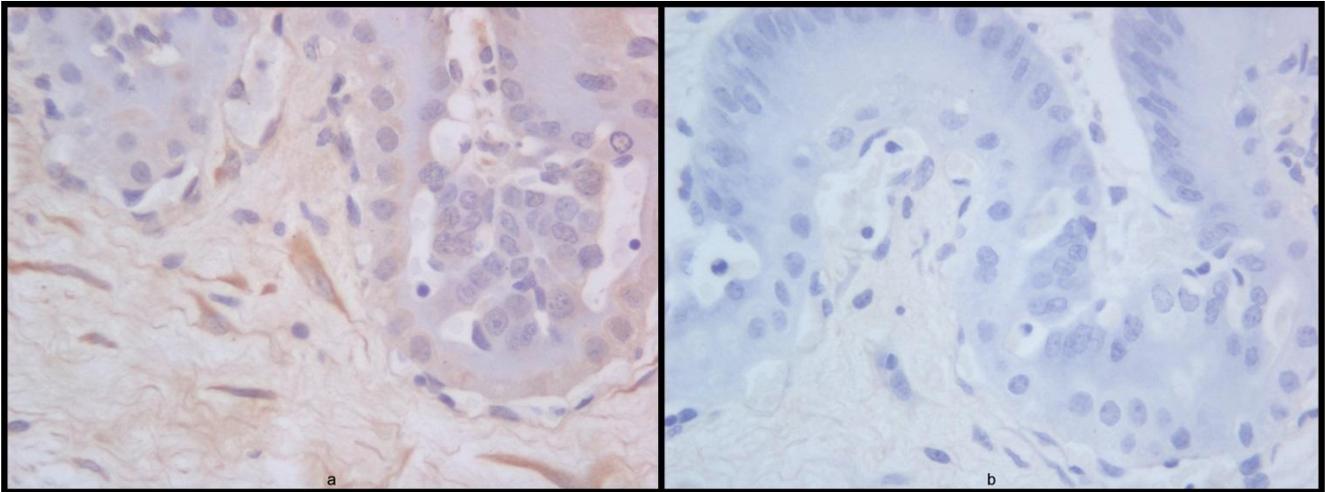


Figura 3a: particolare di fig 2: si evidenzia positività citoplasmatica di cellule fibroblastiche forma fusata o vagamente stellata, staining citoplasmatico irregolare nucleo centrale con forma allungata e pattern cromatinico disperso.(metodica sandwich anti PCV2, obiettivo 63x) b: controllo negativo con assenza di segnale citoplasmatico nei fibroblasti e blando segnale fibrillare della lamina propria (metodica sandwich anti PCV2, omissione anticorpo primario, obiettivo 63x)

Discussione

Alla luce del fatto che la barriera placentare epitelio-coriale della specie suina impedisce il passaggio diaplacentare delle immunoglobuline (Barone, 2003; Furukawa *et al.*, 2014), considerando che il feto produce una quantità irrisoria di immunoglobuline durante la vita intrauterina a partire dai 40 giorni di gestazione in siti parenchimali (Butler e Wertz, 2012), e l'immunocompetenza fetale viene raggiunta a 70 giorni di gravidanza, l'osservazione dell'unità utero-placentare può rappresentare un sito privilegiato di valutazione dell'immunolabeling stromale extracellulare (IgA; IgM ed IgG). E' noto dai testi di immunoistologia che il background che si manifesta con le tecniche immunoistochimiche volte a rivelare le immunoglobuline nei tessuti sia elevato, e viene giustificato con un "uptake" aspecifico di queste molecole ad opera di una varietà di cellule o come uno staining delle immunoglobuline presenti a livello di stroma o siero (Martin, 2010). Viene accettato che si verifichi uno staining non specifico legato ad interazione delle molecole anticorpali di classe IgG ai gruppi basici presenti a livello di fibre collagene (Buchwalow *et al.*, 2011).

L'immunolabelling dell'utero con l'allantochorion ha consentito di identificare una decisa e diffusa positività della matrice extracellulare della *lamina propria* uterina con adiacente una convincente negatività della matrice extracellulare allantocoriale. Tale evidenza immunoistochimica può essere vista come una affascinante dimostrazione della barriera epitelio-coriale placentare suina che

impedisce il passaggio delle immunoglobuline tra madre e feto e risulta essere convincente, anche alla luce del fatto che il pattern predominante non è fibrillare e dunque ascrivibile a legame aspecifico con il collagene, ma amorfo e dunque imputabile a presenza di immunoglobuline nel comparto stromale. Dal momento che il cromogeno diaminobenzidina (DAB) utilizzato non segue la legge di Lambert, non è possibile quantificare la intensità del segnale, ma si possono unicamente effettuare valutazioni qualitative descrittive. Al contrario, il pattern di immunolabelling della matrice extracellulare nei preparati sottoposti a metodica sandwich depone a favore di un legame aspecifico, poiché fibrillare e presente, seppur debolmente, anche nei controlli negativi privi di anticorpo primario. La dimostrazione della veridicità di un segnale extracellulare, si potrebbe verificare con una prova ad hoc utilizzando tessuti di un soggetto sieronegativo. Il segnale manifestato dai fibroblasti stromali dell'endometrio ed allantocoriali e dal lining epiteliale endometriale viene invece reputato reale, ed esso può essere giustificato con la presenza di TLR citoplasmatici.

Bibliografia

Ackermann MR (2012) Inflammation and wound healing. In: Mc Gavin, M.D., Zachary-Mosby, J.F. (Eds.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, fifth ed. Elsevier, 89–146.

Allen WD, Porter P (1973) The relative distribution of IgM and IgA cells in intestinal mucosa and lymphoid tissues of the young unweaned pig and their significance in ontogenesis of secretory immunity. *Immunology* 24, 493–501.

Allen WD, Porter P (1977) The relative frequencies and distributions of immunoglobulin-bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity. *Immunology* 32, 819–824.

Barone R (2003) “Feto e i suoi annessi”, in “Anatomia comparata degli animali domestici”, Vol.4 “Splanchnologia, apparecchio urogenitale, feto e suoi annessi, peritoneo e topografia addominale”, Edagricole, Bologna, 2003.

Bimczok D, Rothkötter HJ (2006) Lymphocyte migration studies. *Vet. Res.* 37, 325–338.

Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russel MW (2008) Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* 1, 31–37.

Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M. Non specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep.* 2011;1:28; 1-6.

Burkey TE, Skjolaas KA, Minton JE (2009) Board invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. *J. Anim. Sci.* 87, 1493–1501.

Butler JE, Wertz N (2012) The porcine antibody repertoire: variations on the textbook theme. *Front Immunol*; 27;3:153.

Cormack DH (1993) CHAPTER 7 Myeloid Tissue, Lymphoid Tissue, and Immune System in CORMACK, D. H., & CORMACK, D. H. (1993). *Essential histology*. Philadelphia, J.B. Lippincott Co.

Day MJ, Schultz DR. (2014) Chapter 5: Cells and tissues of the immune system *Veterinary Immunology: Principles and Practice, Second Edition* CRC Press.

Fairbairn L, Kapetanovic R, Sester DP, Hume DA (2011) The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J. Leukoc. Biol.* 89, 855–871.

Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A (2014) A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol*; 27(1):11-8.

- Guy B (2002) Evaluation of events occurring at mucosal surfaces: techniques used to collect and analyze mucosal secretion and cells. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* 9, 753–762.
- Kim SH, Lee KY, Jang YS (2012) Mucosal immune system and M cell-targeting strategies for oral mucosal vaccination. *Immune Netw.* 12,165–175.
- Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12,319–330.
- Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, Köhler K, Reinacher M (1998) Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet.Immunol. Immunopathol.* 65, 243–257.
- Liebler-Tenorio EM, Pabst R (2006) MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* 37, 257–280.
- Marsilio S, Kleinschmidt S, Harder J, Nolte I, Hewicker-Trautwein M (2011) Numbers and distribution of immune cells in the tunica mucosa of the small and large intestine of full-thickness biopsies from healthy pet cats. *Anat. Histol. Embryol.* 40, 61–67.
- Martin AW *Immunohistology of Non-Hodgkin Lymphoma* David J. Dabbs MD "Diagnostic Immunohistochemistry: Therapeutic and Genomic Applications, Expert Consult" Saunders 2010.
- Meng XJ (2013) Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1,43–64.
- Mueller SN, Germain RN (2009) Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol*; 9(9):618-29.
- Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC (2011) Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol*; 73:213-37.
- Rose N, Opriessing T, Grasland B, Jestin A (2012) Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164,78–89.
- Sarli G, Morandi F, Panarese S, Ostanello F, Bianco C, Ferrara D, Galeati G, Bacci ML, Dottori M, Bonilauri P, Lelli D, Leotti G, Vila T, Joisel F (2012) PCV2 shedding after challenge by infected semen in PCV2 vaccinated and non-vaccinated conventional gilts. In: Proceedings 43rd Annual Meeting AASV (American Association Swine Veterinarians), pp. 383–384.
- Sato A, Iwasaki A, (2005) Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1333–1338.
- Snoeck V, Peters IR, Cox E (2006) The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet. Res.* 37, 455–467.

Stokes CR, Bailey M (2000) The porcine gastrointestinal lamina propria:an appropriate target for mucosal immunisation? *J. Biotechnol.* 83,51–55.

Stzepourginski I, Eberl G, Peduto L (2015) An optimized protocol for isolating lymphoid stromal cells from the intestinal lamina propria. *J Immunol Methods.* 2015 in press.

Tizard IR (2013) *Veterinary Immunology: an introduction.* Saunders Elsevier, St. Louis, MO, pp. 113–126 (chapter 10).

Trible BR, Kerrigan M, Crossland N, Potter M, Faaberg K, Hesse R, Rowland RR (2011) Antibody Recognition of Porcine Circovirus Type 2 Capsid Protein Epitopes after Vaccination, Infection, and Disease *Clin Vaccine Immunol.*; 18(5):749-57.

Vincent IE., Balmelli C, Meehan B, Allan G, Summerfield A, McCullough KC (2007) Silencing of natural interferon producing cellactivation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology* 120, 47–56.

Waly N, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ (2001) The distributionof leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *J. Comp.Pathol.* 124, 172–182.

Wilson HL, Obradovic MR. (2014) Evidence for a common mucosal immune system in the pig. *Mol Immunol.* 2014 in press

Capitolo 5

Premessa

Il presente lavoro è stato condotto durante la permanenza, nell'ambito del periodo all'estero durante il Dottorato, presso Veterinary Pathology, School of Veterinary Science, University of Liverpool, nel periodo marzo-giugno 2014. Durante tale periodo il sottoscritto ha sviluppato tale progetto assieme al team composto da: L. Ressel (PhD, DVM, MRCVS Lecturer in Veterinary Pathology, Head of Immunohistology Services), E. Ricci (PhD, DVM, MRCVS Lecturer in Veterinary Pathology), R. Verin (Dr. Ranieri Verin DVM, PhD, MRCVS, Dipl. ECZM (Wildlife Population Health) Lecturer in Veterinary Pathology). I risultati sono da considerarsi preliminari e non sono stati ancora pubblicati.

Istopatologia quantitativa e caratteristiche istologiche della atrofia muscolare del muscolo scheletrico indotta da “starvation” nella specie canina: implicazioni rilevanti in campo forense

“Histopathology and quantitative pathology of skeletal muscle in starved dogs: relevant forensic oriented findings”

Introduzione

Recentemente l'attenzione dei veterinari si è concentrata sugli aspetti clinico-patologici dei fenomeni atrofici del muscolo scheletrico indotti da invecchiamento (sarcopenia), neoplasia (cachessia) ed emaciazione (starvation) (Hutchinson *et al.*, 2012; Freeman, 2012; Lawler, 2011_{a,b,c}; Pointer 2013). Anche il patologo veterinario oggi ha iniziato ad occuparsi della problematica della starvation (Merck 2007; Munro e Munro 2008; Stern, 2013) e dei reperti *post-mortem* con significato forense (Stacy *et al.*, 2014.). La starvation è poco nota in campo medico forense, a parte in episodi sporadici di infanticidio, o nei casi di “sciopero della fame”, su base volontaria (Altun *et al.*, 2004; Dolinak *et al.*, 2005; Saukko e Knight, 2004). In patologia veterinaria forense, la starvation è una condizione frequente, e la causa più comune è la mancanza di una adeguata quantità di nutrienti qualitativamente corretti, con implicazioni legali, giacchè vi possono essere tratti di negligenza o volontarietà nell'induzione di detta condizione (Merck 2007; Munro e Munro, 2008). L'atrofia del muscolo scheletrico è una conseguenza debilitante della starvation. Le risposte alla privazione di cibo in uccelli e mammiferi procedono a tappe, che esitano con la morte. Il periodo iniziale prevede il digiuno, e le fasi successive starvation. La linea di demarcazione tra questi due stati è raramente chiarita, forse a causa della mancanza di definizione (Wang *et al.*, 2006). I muscoli scheletrici costituiscono circa il 40% - 50% del peso corporeo totale nei mammiferi; il muscolo è un tessuto postmitotico, arrivando al suo numero finale delle cellule (fibre muscolari), all'inizio della vita, dopo di che le variazioni di dimensione dei muscoli dipendono dalla variazione nelle dimensioni delle miofibre individuali (Romanick *et al.*, 2013). I muscoli sono anche il più grande serbatoio di proteine nel corpo. Dunque i muscoli servono come una fonte di aminoacidi che possono essere utilizzati per la produzione di energia da vari organi (compreso il cuore, fegato e cervello) durante i periodi catabolici. L'atrofia muscolare è stata definita da Marco Sandri come "diminuzione volumetrica delle miofibre a causa di una perdita netta di proteine, organelli e citoplasma.." (Sandri, 2013). Le pathway biochimiche di controllo dell'atrofia muscolare,

attraverso sistemi proteolitici in condizioni fisiologiche e patologiche, sono rappresentate dal complesso ubiquitina-proteasoma ed dalla via autofagica-lisosomiale. Il coinvolgimento di questi sistemi in fisiopatologia muscolare, così come le vie di segnalazione che controllano la loro attività, sono stati svelati solo negli ultimi anni, e le evidenze indicano che questi due processi hanno un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi muscolare generale (Bonaldo e Sandri, 2013). Il sottoinsieme dei geni, o meglio il programma genetico che sono marcatamente sovraregolati con atrofia derivante dalla cachessia e disuso, sono chiamati geni atrofia correlati o "atrogenes" (Sacheck *et al.*, 2007). L'istopatologia veterinaria forense si è occupata raramente del fenomeno della starvation nella specie canina. Mentre al contrario sono disponibili numerosi parametri macroscopici di riferimento per la valutazione della condizione corporea del cane (German *et al.*, 2006). Lo scopo di questo studio è la caratterizzazione istopatologica quantitativa mediante analisi di immagine digitale delle caratteristiche dell'atrofia muscolare indotta da starvation, affiancato allo studio di reperti istologici qualitativi.

Materiali e metodi

Selezione della casistica

Il database del dipartimento di Veterinary Pathology-School of Veterinary Science-University of Liverpool, è stato consultato. I cani sottoposti ad esame necroscopico ed approfondimento istologico, con la diagnosi definitiva macroscopica ed istologica di morte dovuta a starvation (gruppo starvation) sono stati selezionati. I criteri di inclusione erano:

- età superiore ad 1 anno
- punteggio semi quantitativo (4 punteggi della condizione corporea disponibile).
- disponibilità di preparati istologici (ematossilina ed eosina) di una sezione trasversale di almeno uno dei seguenti muscoli scheletrici (quadricipite femorale, sovraspinato, sottospinato, diaframma).

Il database del dipartimento di Veterinary Pathology-School of Veterinary Science-University of Liverpool, è stato consultato, I cani sottoposti ad esame necroscopico ed approfondimento istologico, con la diagnosi definitiva macroscopica ed istologica di assenza di malattie croniche e con normale condizione corporea (gruppo controllo), sono stati selezionati. I criteri di inclusione erano:

- età superiore ad 1 anno
- punteggio semi quantitativo (4 classi) della condizione corporea disponibile.
- razza nota.

- disponibilità di preparati istologici (ematossilina ed eosina) di una sezione trasversale di almeno uno dei seguenti muscoli scheletrici (quadricipite femorale, sovraspinato, sottospinato, diaframma).

Animali il cui peso atteso era inferiore a 15 kg sono stati inclusi nella categoria di peso A, mentre i soggetti il cui peso previsto era superiore a 15 kg sono stati inclusi nella categoria di peso B, per consentire la comparabilità (Braund *et al.*, 1982). Tutti i confronti sono stati effettuati tra gruppi all'interno di ciascuna categoria.

Il punteggio semi quantitativo di atrofia muscolare è stato valutata sulla foto di carcasse scuoiate in decubito laterale destro e sinistro. Lo scoring è stato condotto in accordo con i seguenti criteri, con l'identificazioni di quattro punteggi (modificata da Merck, 2007):

1-normale (controllo): sviluppo muscolare armonico e adeguato, con la normale quantità di tessuto adiposo sottocutaneo. Le prominenze scheletriche non sono evidenti.

2-lieve: massa muscolare leggermente ridotta, con l'assenza di tessuto adiposo sottocutaneo. Le strutture scheletriche non sono prominenti.

3-moderato: massa muscolare moderatamente ridotta, con l'assenza di grasso sottocutaneo. Le strutture scheletriche sono evidenti (coste, vertebre lombari e ossa del bacino).

4-grave: massa muscolare gravemente ridotta, con l'assenza di grasso sottocutaneo. Le strutture scheletriche sono molto importanti (coste, vertebre lombari, colonna vertebrale, spina della scapola, femore e ossa del bacino).

Lo scoring è stato eseguito da tre patologi con esperienza in campo forense veterinario (LR, ER, RV).

Il punteggio semi-quantitativo è stato utilizzato come criterio per la creazione di sottogruppi (cani con condizione corporea normale, cani lievemente emaciati, moderatamente emaciati e gravemente emaciati).

Istopatologia, analisi di immagine e patologia quantitativa

L'esame istopatologico quantitativo ed istologico descrittivo del muscolo sono stati condotti su preparati istologici codificati con modalità single-blind. Per ogni preparato istologico di quadricipite femorale disponibile dei cani di categoria A (di peso > 15 kg), sono state acquisite cinque foto a 20X di ingrandimento (campi non adiacenti) con un microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon Corporation, Giappone), con software Element NIS (Nikon Corporation, Giappone) (immagini: 2560x1920 pixel, jpeg, 6 pixel/μm). L'analisi delle immagini digitali è stata condotta con il freeware Fiji su ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>) da un patologo sulle foto codificate. In breve, le immagini sono state pre-processate e segmentate manualmente, controllate e corrette; la segmentazione è stata seguita da misurazione

automatica del minimo diametro Feret, il coefficiente di variazione del diametro Feret (deviazione standard / media espresso in percentuale %) e la solidità (indicatore di forma). Circa 150 miofibre per ogni muscolo sono state misurate, in conformità con le indagini precedenti sulla specie canina, e tenendo conto di prove metodologiche *ad hoc* focalizzate sulla determinazione del minimo campione rappresentativo verificato su specie murine (Ceglia *et al.*, 2013).

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il software SPSS 20 (IBM Corp., NY, USA). La distribuzione dei dataset è stata analizzata con il test di Shapiro-Wilk; per i dati non normalmente distribuiti, un confronto non parametrico con test post hoc è stato effettuato (Kruskal-Wallis), per i dati normalmente distribuiti, è stato eseguito un test Anova con post hoc. La significatività statistica è stata fissata con $p = 0,05$. Per la determinazione del valore di soglia del dato quantitativo (diametro minimo Feret delle miofibre), una curva ROC è stata costruita, confrontando i dati degli animali di controllo di gruppo con i dati a in pool dei cani del gruppo starvation; l'area sotto la curva (AUC) e le coppie di sensibilità e specificità sono stati presentati con un valore cut off di diametro minimo Feret delle miofibre.

Risultati

Nella categoria di peso A sono stati selezionati sei soggetti (due nel gruppo di controllo e quattro moderatamente emaciati), tra cui cinque femmine intere ed una femmina sterilizzata. Nella categoria di peso B sono stati selezionati ventidue cani (sei controllo e sedici emaciati). Tra cui sei soggetti nel gruppo di controllo (27%), due lievemente emaciati (10%), otto moderatamente emaciati (36%) e 6 gravemente emaciati (27%); tra essi, 13 erano i maschi interi (60%), cinque le femmine intere (23%), tre le femmine sterilizzate (13%) e 1 soggetto era castrato (4%). Sono stati selezionati 57 preparati istologici di muscolo scheletrico, tra cui: 23 quadricipite, 18 diaframma, 9 sovraspinato, 7 sottospinato. I dati di segnalamento dei soggetti selezionati sono presentati nella tabella 1.

Tabella 1: segnalamento dei soggetti, categoria di peso, condizione corporea, preparati istologici di muscolo scheletrico disponibili.

<i>Categoria</i>	<i>Razza</i>	<i>Sesso</i>	<i>Peso (kg)</i>	<i>Età (anni)</i>	<i>Condizione corporea</i>	<i>quadricipite</i>	<i>Sovraspinato</i>	<i>Infraspinato</i>	<i>Diaframma</i>
B	Boxer	m	19,00	Non nota	STARVATION GRAVE	X			
A	Yorkshire Terrier	f	1,25	Non nota	STARVATION MODERATA				X
B	Staffordshire bull terrier	f	9,45	Non nota	STARVATION MODERATA	X			X
B	Staffordshire Bull Terrier	f	6,00	Non nota	STARVATION GRAVE	X	X		X
B	Pastore tedesco	m	40,00	7	CTR				X
A	Yorkshire Terrier (incrocio)	f	1,85	Non nota	STARVATION MODERATA	X	X		X
B	Non nota	m	15,00	Non nota	STARVATION MODERATA	X		X	X
B	Lurcher	s	11,60	Non nota	STARVATION GRAVE			X	X
A	Chihuahua	f	1,70	Non nota	STARVATION MODERATA	X		X	X
B	Lurcher	f	10,88	Non nota	STARVATION GRAVE	X	X		X
B	Labrador	c	26,00	8	CTR	X			
B	Rottweiler	m	19,00	Non nota	STARVATION MODERATA	X		X	X
B	Labrador	s	Non noto	6	CTR	X			
B	Border Collie	m	9,50	Non nota	STARVATION GRAVE	X			X
B	Weimaraner	s	Non noto	7	CTR	X			
B	Rottweiler	m	25,00	Non nota	STARVATION MODERATA	X		X	X
B	Rottweiler	m	30,00	Non nota	CTR	X		X	X
B	Akita Type	m	22,00	4	STARVATION LIEVE			X	X
B	Cocker Spaniel	m	9,80	2	STARVATION LIEVE	X	X		
B	Bull Terrier Type	f	6,00	2	STARVATION MODERATA	X	X		
B	Staffordshire bull terrier (incrocio)	m	9,20	2	STARVATION MODERATA	X	X		X
B	Akita	m	34,00	Non nota	CTR	X	X		
A	Lhasa Apso	f	5,30	3	CTR	X			
A	Barboncino Nano	s	10,60	8	CTR	X			
A	Shih Tzu	f	3,60	Non nota	STARVATION MODERATA	X			
B	Alano	m	10,00	Non nota	STARVATION GRAVE		X		X
B	Staffordshire Bull Terrier	m	13,50	5	STARVATION MODERATA	X	X		X
B	Springer Spaniel	f	10,04	7	STARVATION MODERATA	X			X

Legenda: m=maschio; f=femmina; c= maschio castrato; s=femmina sterilizzata

L'aspetto istologico dei cani dei gruppi di controllo è risultato nei limiti della norma (figura 1a). Il muscolo scheletrico coinvolto da un processo atrofico imputabile a starvation mostravano istologicamente una grave e diffusa diminuzione del diametro delle miofibre, caratterizzate da forme angolari o allungate (figura 1d, figura 1g). Gli spazi perimisiali ed endomisiali erano moderatamente e regolarmente espansi da spazi chiari otticamente vuoti (edema) talvolta contenenti materiale flocculento proteico (figura 1d, figura 1g). Si identificano multifocali miofibre con pressochè totale deplezione sarcoplasmatica, caratterizzate dalla stretta aggregazione di 4-5 nuclei (nuclear clumping). I nuclei centrali sono presenti ma nei limiti della norma. Si apprezzavano talvolta focolai di miofibrillolisi infiammatoria e non infiammatoria. La fibrosi era costantemente assente, non si rilevano sostituzioni delle miofibre ad opera di adipociti, al pari dell'infiltrato infiammatorio, rilevabile unicamente nei foci di miofibrillolisi infiammatori che sono apparsi raramente. I foci di rigenerazione muscolare erano assenti.

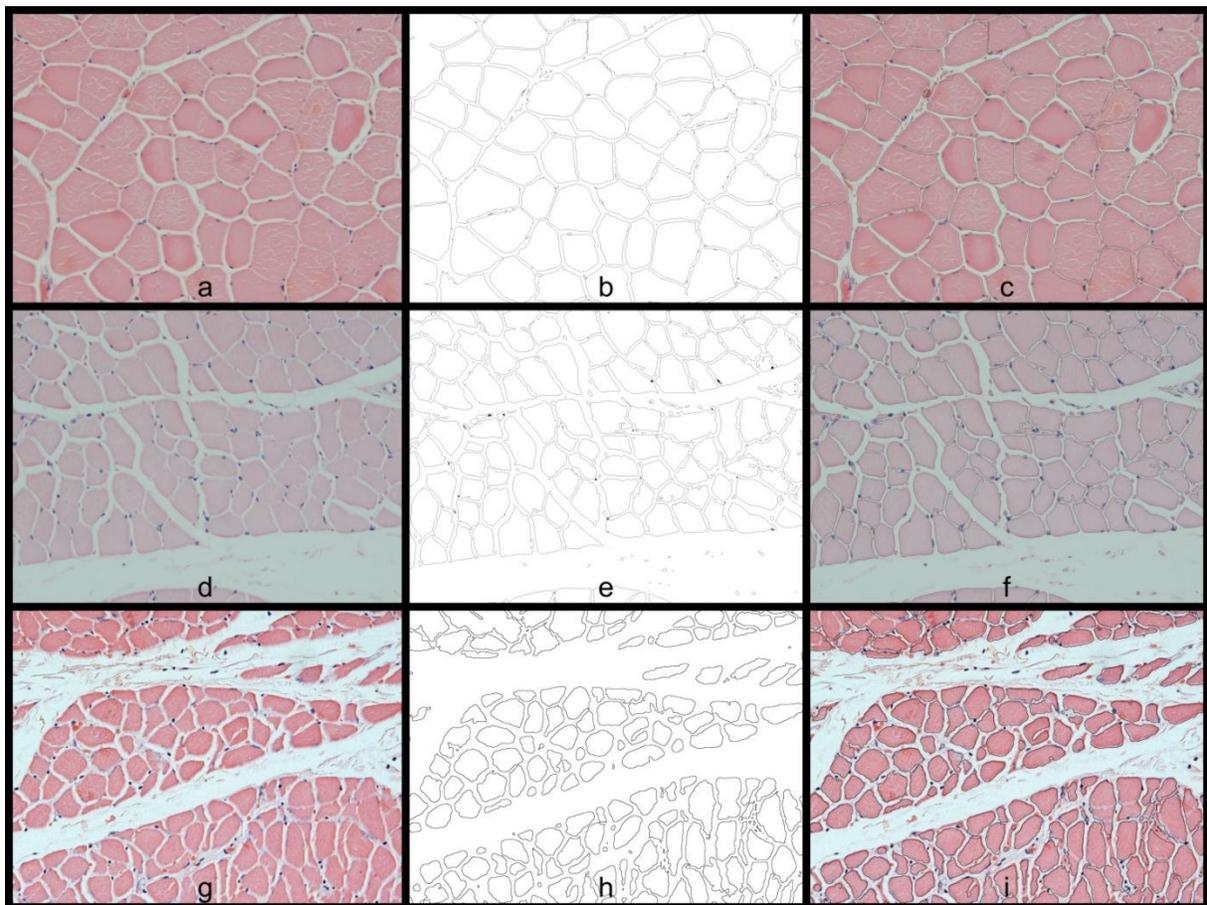


Figura 1a: cane labrador, controllo, diametro feret medio $38,25 \pm 10,31 \mu\text{m}$; solidità=0,91; **1b** esempio di processazione di 1a. **1c** sovrapposizione di 1b ed 1a. **1d:** cane Staffordshire bull terrier, moderato livello di starvation, diametro feret medio $25,47 \pm 1,17 \mu\text{m}$; solidità=0,89; **1e:** esempio di processazione di 1d. **1f:** sovrapposizione di 1d ed 1e; **1g:** cane Staffordshire Bull Terrier, grave livello di starvation, diametro feret medio $18,01 \pm 0,85 \mu\text{m}$; solidità=0,88; **1h** esempio di processazione di 1g. sovrapposizione di 1g ed 1h (ematossilina-eosina-Ob 20x)

I preparati di quadricipite di undici animali del gruppo starvation (7 moderatamente emaciati e 4 gravemente emaciati) e quattro cani del gruppo di controllo sono stati selezionati per l'analisi di immagine. Per ciascun soggetto, 167 ± 58 miofibre del quadricipite sono state misurate. La distribuzione dei dati delle misure del diametro feret minimo era normale (Shapiro-Wilk $W = 0,92420$, $p = 0,22318$); il diametro medio di Feret del quadricipite del gruppo di controllo era $39,68 \pm 3,05 \mu$, mentre gli animali moderatamente emaciati mostravano un diametro medio di $20,53 \pm 4,59 \mu$, infine i gravemente emaciati erano caratterizzati da un diametro medio pari a $24,28 \pm 5,91 \mu$; la differenza tra il gruppo di controllo e gli altri gruppi è risultata statisticamente significativa (Anova con correzione post-hoc di Bonferroni; $p < 0,01$), mentre la differenza tra animali moderatamente e gravemente emaciati non era significativa ($p = 0,669$) (plot 1). I dati del coefficiente di variazione (cv) del diametro minimo feret non erano normalmente distribuiti (Shapiro-Wilk $W = 0,83703$, $p = 0,01144$), la mediana del gruppo di controllo era 10,3% (range = 2,03-26,25%), la cv nel gruppo dei soggetti moderatamente emaciati era 5,24% (mediana) (range = 1,08- 36,68%), mentre i cani gravemente emaciati mostravano un cv mediano di 7,48% (range = 4,25-14,30%); la differenza tra i gruppi non era significativa (Kruskal-Wallis $p = 0,96$). I dati di solidità non erano normalmente distribuiti (Shapiro-Wilk $W = 0,83703$, $p = 0,01144$). I dati della solidità mediana del quadricipite del gruppo di controllo era 0,91 (range = 0,91-0,94), mentre gli animali dei gruppi starvation mostravano una solidità mediana di 0,87 (intervallo = 0,79-,92) (moderatamente emaciati) e 0,90 (range = 0,88-0,91) (gravemente emaciati); la differenza tra i gruppi è risultata statisticamente significativa ($p = 0,023$), poichè animali moderatamente affamati avevano la solidità inferiore; il confronto pairwise ha evidenziato come la differenza significativa fosse presente solo tra animali moderatamente emaciati e normali ($p=0,006$) (grafico 2). E' stato determinato il valore cutoff del diametro minimo di feret medio pari a $25,26 \mu$, con sensibilità = 0,818 e specificità = 1,000 (AUC=1).

Discussione

Per quanto a conoscenza degli autori, indagini volte a caratterizzare i cambiamenti istopatologici ed istologici quantitativi dell'atrofia muscolare indotta da starvation nella specie canina non sono presenti nello scenario della patologia forense veterinaria, mentre sono stati condotti studi clinico-patologici anche con specifiche prove sperimentali finalizzate a valutare le alterazioni biochimiche e clinico-patologiche causate dalla starvation o dal digiuno (Rodriguez *et al*, 1986;. de Bruijne *et al*, 1983; Manabe *et al*, 1987), o attraverso studi clinici retrospettivi (Pointer *et al*, 2013). L'unico studio istopatologico sistematico su questo argomento, è stato effettuato sulla specie ovina, in questa indagine

l'atrofia selettiva differenziale delle diverse miofibre sono stati valutati e descritti attraverso metodica istochimica muscolare (Hulland, 1981), ma i risultati istologici non sono stati riportati.

Il muscolo scheletrico coinvolto da un processo atrofico imputabile a starvation mostra istologicamente una grave e diffusa diminuzione del diametro delle miofibre, caratterizzate da forme angolari o allungate, poiché sono depauperate dell'apparato miofibrillare e putativamente si verificano atrofie selettive. Gli spazi perimisiali ed endomisiali sono moderatamente e regolarmente espansi da spazi chiari otticamente vuoti (edema) talvolta contenenti materiale flocculento proteico, interpretabile come materiale proteico di origine plasmatica, conseguenza della grave riduzione della pressione colloid-osmotica che caratterizza la starvation. Si identificano multifocali miofibre con pressochè totale deplezione sarcoplasmatica, caratterizzate dalla stretta aggregazione di 4-5 nuclei (nuclear clumping). Tale rilievo istologico si verifica nell'atrofia muscolare da denervazione dopo lunghi periodi (Adami et al., 2009), e rappresenta istologicamente un riposizionamento dei mionuclei dalla disposizione elicoidale subsarcolemmale (coil) ad una centrale aggregata, a causa della quasi totale scomparsa della componente sarcoplasmatica contrattile (estrema atrofia). I nuclei centrali sono presenti ma nei limiti della norma. Si apprezza talvolta la presenza di focolai di miofibrillolisi infiammatoria e non infiammatoria. La fibrosi è costantemente assente, non si rilevano sostituzioni delle miofibre ad opera di adipociti, al pari dell'infiltrato infiammatorio, rilevabile unicamente nei foci di miofibrillolisi infiammtaori che sono apparsi raramente. I foci di rigenerazione muscolare erano assenti.

La base istologica quantitativa della riduzione macroscopica di massa muscolare è una diminuzione significativa del diametro minimo feret delle miofibre (inferiore a 25 μm). La differenza di tale parametro istologico delle miofibre tra i gruppi di controllo, moderatamente e gravemente emaciati è significativo, ma non si evidenzia alcuna differenza tra i gruppi moderatamente e gravemente emaciati, in termini di valore medio.

Confrontando il coefficiente di variazione dei tre gruppi (sd normalizzato, espresso in percentuale), si apprezza una tendenza, anche se non statisticamente significativa: è emerso che il cv è maggiore nel gruppo di animali moderatamente emaciati, rispetto agli altri due gruppi. Questa variabilità è coerente con l'adattamento plastico delle fibre muscolari che durante il deterioramento della condizione corporea selettivamente e transitoriamente sono caratterizzate da un'ipertrofia delle fibre di tipo I, sincrono con l'atrofia delle fibre di tipo II (Hulland, 1981). L'atrofia / ipertrofia selettiva e transitoria di diversi sottopopolazione di miofibre è comune a diversi processi patologici (Nghiem *et al.*, 2009).. I dati quantitativi riguardanti tale variazione del diametro Feret nei cani con condizioni corporee scadenti riflettono e supportano i descrittori istologici, spesso utilizzate in rapporti forensi ("...da lieve

a moderata variazione di diametro delle miofibre"). Può essere ipotizzato che la riduzione della massa muscolare nella progressione dell'atrofia da livelli moderati a livelli gravi possa essere dovuto a fenomeni di necrosi, poiché l'importanza dell'apoptosi in una cellula sinciziale multinucleata postmitotica adulta appare molto limitato.

La macro sviluppata con imagej si è mostrata efficace nella segmentazione delle miofibre o miociti (oggetti di interesse) dallo sfondo (background), ed uno step manuale di controllo e correzione ha completato l'elaborazione delle immagini prima delle misurazioni automatizzate, ottenute con imagej. L'utilizzo di imagej e la misurazione del diametro minimo feret (Minimal Feret's diameter) è già stato utilizzato in lavori di miopatologia veterinaria (Nghiem *et al.*, 2009) ed è utilizzato in patologia muscolare umana (Dubowitz *et al.*, 2013). Durante le fasi di processazione e segmentazione delle immagini le maggiori problematiche riscontrate sono state le seguenti: miofibre con confini intercellulari non netti o fusi, segmentazione di strutture non muscolari (vasi, tessuto connettivo), artefatti da congelamento ed autolisi. Queste problematiche rilevate sono state in linea con quelle evidenziate dagli studi precedenti (Liu *et al.*, 2013) e sono state corrette mediante thresholding manuale e correzione manuale prima della fase finale di misurazione automatica. Deve essere nuovamente sottolineato il fatto che i tessuti muscolari sono stati ottenuti da casi forensi, quindi, la qualità intrinseca era spesso bassa. La condizione di conservazione delle carcasse era sconosciuta e l'autolisi è stata spesso rilevata.

L'indicatore di forma adottata, la solidità, sembrava la più coerente con il descrittore istologico "fibre di forma diversa." I fattori di forma (shape factors o shape metrics) sono parametri adimensionali di largo impiego in analisi di immagine e sono indipendenti dalle dimensioni; sono calcolati a partire da misure geometriche euclidee (perimetro, area, diametro). La solidità è infatti un indicatore adimensionale, i cui valori compresi tra 0 e 1, si ottiene matematicamente dal rapporto tra area dell'oggetto in esame ed area convessa (convex hull); per area convessa si intende il poligono di minori dimensioni che circonda o contiene tutti i punti dell'oggetto in esame. Ne deriva che tanto più il convex hull approssima l'oggetto in esame, tanto più il valore approssima 1; se invece l'oggetto analizzato ha una forma molto irregolare, la solidità diminuisce e si allontana da 1 (<http://imagej.nih.gov/ij/list.html>). Nel caso delle miofibre, la solidità è maggiore quando le fibre sono normali (vagamente poligonali) e diminuisce con la distorsione della forma, con la concavità complessiva delle stesse, nel presente studio rappresentate dalle fibre angolari. Anche se questo indicatore è significativamente più basso nel gruppo di animali moderatamente emaciati, il suo valore

negli animali gravemente emaciati non è risultato diverso da quello misurato nel gruppo di controllo. Questi risultati possono essere spiegati dalla citata plasticità del muscolo durante i processi atrofici. Durante la fase di selezione della casistica, numerosi soggetti sono stati esclusi perché, nonostante presentassero moderati o gravi livelli di atrofia muscolare, dopo esame *post-mortem* completo e valutazione istologica, la starvation è stata esclusa come causa ultima della morte. Tali soggetti presentavano: nefropatie croniche, malattie cardiache (endocardiosi e cardiomiopatia dilatativa congestizia), tumori maligni con evidenza di cachessia paraneoplastica, endocrinopatie, malattie ortopediche o neuromuscolari; secondo studi summenzionati, tutte queste sindromi cliniche croniche sono causa di atrofia muscolare. Il diametro Feret minimo è definito come la minima distanza possibile tra due tangenti parallele di un oggetto (miofibra). Il diametro minimo di Feret è poco influenzato dall'orientamento dell'angolo di sezione (cioè obliquità delle sezioni delle miofibre) e dunque estremamente robusto. C'è accordo nella comunità scientifica sul fatto che il diametro minimo Feret è uno dei principali parametri che determinano la salute e la funzionalità del muscolo (Pernús e Erzen, 1994; Briguet *et al.*, 2004). Comparando i dati ottenuti nel presente esperimento con i dati presenti in bibliografia, si apprezza una concordanza accettabile tra il diametro minimo di feret delle miofibre di cani normali sopra i 15 kg ($39.68 \pm 3.05 \mu$), riportati essere tra 40 e 55 μ m su campioni ottenuti da cani normali (Braund *et al.*, 1982; Gerth *et al.*, 2009; Nghiem *et al.*, 2009). La variabilità dei dati presenti in letteratura è dovuta senza dubbio allo studio di cani di razze diverse, con diversi livelli di attività, con diverse modalità di campionamento (biopsie), e la valutazione di diversi muscoli, infine, la crioprocessazione di campioni che è stata sistematicamente adottata negli studi di miopatia veterinaria citati non è soggetta alla coartazione causata dalla fissazione in formalina e l'inclusione in paraffina, presente nei campioni analizzati nel presente studio, si sottolinea nuovamente che i soggetti esaminati nel presente studio sono casi forensi, con intrinseca bassa qualità dei preparati per la presenza di fenomeni autolitici ed artefattuali da congelamento.

L'analisi complessiva dei soggetti venuti a morte per starvation, identifica una popolazione predominante di razze di media o grande taglia, con solo 4 cani di piccola taglia (sotto i 15 kg di peso corporeo). Inoltre si evidenzia come gran parte i soggetti venuti a morte per starvation erano caratterizzati da livelli di atrofia muscolare ed emaciazione moderata o grave. La dimensione del campione, in termini di numero di soggetti e di numero di miofibre misurate per ciascun soggetto, anche confrontando il presente studio ad altre indagini, è apparso adeguato.

In conclusione, alla luce dei parametri quantitativi istologici e di quelli qualitativi istopatologici, è possibile suggerire che un diametro medio minimo di feret delle miofibre inferiore a 25 μ m, la presenza

frequente di nuclear clumping, l'edema endomisiale e perimisiale moderato con assenza di fibrosi, siano caratteristiche istologiche altamente suggestive di atrofia muscolare cronica indotta da starvation.

Bibliografia

Adami N, Biral D, Corbianco S, Zampieri S, Carraro U, Kern H (2009) Fiber types of human atrophic myofibers with nuclear clumps *Basic Applied Myology*; 19 (5&6): 225-228.

Altun G, Akansu B, Altun BU, Azmak D, Yilmaz A (2004) Deaths due to hunger strike: post-mortem findings. *Forensic Sci Int.* 10;146(1):35-8.

Bonaldo P, Sandri M (2013) Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms* 6, 25-39.

Briguet A, Courdier-Fruh I, Foster M, Meier T, Magyar JP (2004) Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul Disord.*; 14(10):675-82.

Braund KG, McGuire JA, Lincoln CE (1982) Observations on normal skeletal muscle of mature dogs: a cytochemical, histochemical, and morphometric study. *Vet Pathol.* 1982 ;19(6):577-95.

Ceglia L, Niramitmahapanya S, Price LL, Harris SS, Fielding RA, Dawson-Hughes B (2013) An evaluation of the reliability of muscle fiber cross-sectional area and fiber number measurements in rat skeletal muscle. *Biol Proced Online*; 15(1):6.

de Bruijne JJ, Lopes-Cardozo M. (1983) Ketogenesis in mitochondria isolated from liver biopsies of normal and starved dogs: comparison with rat-liver mitochondria. *Comp Biochem Physiol B.* ;75(4):557-62.

Dolinak D, Matshes E, Lew EO (2005) Chap 17: Child Abuse Forensic Pathology: Principles and Practice. in *Forensic Pathology Principles and Practice-* Academic Press, 370-409.

Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A (2013) CHAPTER 4. Definition of pathological changes seen in muscle biopsies in *Muscle Biopsy: A Practical Approach* ED Elsevier Health Sciences.

Freeman LM (2012) Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. *J Vet Intern Med*; 26(1):3-17.

German AJ, Holden SL, Moxham GL, Holmes KL, Hackett RM, and RawlingsJM. (2006) A Simple, Reliable Tool for Owners to Assess the Body Condition of Their Dog or Cat *J. Nutr.* 136: 2031S–2033S.

Gerth N, Sum S, Jackson S, Starck JM. (2009) Muscle plasticity of Inuit sled dogs in Greenland. *J Exp Biol.* 212(Pt 8):1131-9.

Haidet GC, Parsons D. (1991) Reduced exercise capacity in senescent beagles: an evaluation of the periphery. *Am J Physiol* 260: 173-182.

- Hulland TJ. (1981) Histochemical and Morphometric Evaluation of Skeletal Muscle of Cachectic Sheep *Vet. Pathol.* 18: 279-298.
- Hutchinson D, Sutherland-Smith J, Watson AL, Freeman LM (2012) Assessment of methods of evaluating sarcopenia in old dogs. *Am J Vet Res.* ;73(11):1794-800.
- Lawler DF (2011b) The changing understanding of ageing. Part 2: Body composition, metabolism and cell death. *Vet Ital*;47(3):241-53.
- Lawler DF (2011c) The changing understanding of ageing. Part 3: Diseases of ageing. *Vet Ital*;47(3):255-69.
- Lawler DF. (2011a) The changing understanding of ageing. Part 1: Evaluating ageing theories and studies. *Vet Ital*.;47(3):229-40.
- Liu F, Mackey AL, Srikuea R, Esser KA, Yang L. (2013) Automated image segmentation of haematoxylin and eosin stained skeletal muscle cross-sections *Journal of Microscopy*, Vol. 252, 3: 275–285.
- Manabe T, Tanaka Y, Yamaki K, Asano N, Nonaka A, Hirano T, Nishikawa H, Tobe T. (1987) The role of plasma secretin during starvation in dogs. *Gastroenterol Jpn* ; 22(6): 756-8.
- Merck DM (2007) Chapter 11 Patterns of Non accidental injury: neglect. in *Veterinary Forensics: Animal Cruelty Investigations* -Blackwell Pub; 201-223.
- Munro R, Munro HMC (2008) Chapter 5: Neglect. in *Animal Abuse and Unlawful Killing* -Forensic veterinary pathology Saunders; 17-29.
- Nghiem PP, Hoffman EP, Mittal P, Brown KJ, Schatzberg SJ, Ghimbovski S, Wang Z, Kornegay JN. (2013) Sparing of the dystrophin-deficient cranial sartorius muscle is associated with classical and novel hypertrophy pathways in GRMD dogs. *Am J Pathol.*;183(5):1411-24.
- Pernus F, Erzen I (1994) Fibre size, atrophy, and hypertrophy factors in vastus lateralis muscle from 18- to 29-year-old men. *J Neurol Sci.*;121(2):194-202.
- Pointer E, Reisman R, Windham R, Murray L (2013) Starvation and the clinicopathologic abnormalities associated with starved dogs: a review of 152 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.*;49(2):101-7.
- Rodriguez J, Bruyns J, Askanazi J, DiMauro W, Bordley J , Elwyn DH, Kinney JW (1986) Carnitine metabolism during fasting in dogs. *Surgery.*;99(6):684-7.
- Romanick M, Thompson LV, Brown-Borg HM (2013) Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*;1832(9):1410-20.

Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. (2007) Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* ;21(1):140-55.

Sandri M (2013) Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol.*;45(10): 2121-9.

Saukko P, Knight B (2004) Chapter 17 Neglect, starvation and hypothermia. in *Knight's Forensic Pathology*, 3Ed; CRC Press; 412-420.

Stacy BA, Costidis AM, Keene JL (2014) Histologic Changes in Traumatized Skeletal Muscle Exposed to Seawater: A Canine Cadaver Study. *Vet Pathol.* 52(1):170-5.

Stern J (2013) Starvation Due To Neglect: A Canine Case Series. *Vet Sci Technolo*; 4:1-2.

Wang T, Hung CCY, Randall DJ. (2006) The comparative physiology of food deprivation: From Feast to Famine *Annu. Rev. Physiol.* 68: 223–51.

Capitolo 6

**METODO “SCANNER-FOTOGRAFICO” PER LA QUANTIFICAZIONE
DELLA PENETRAZIONE E DEL PATTERN DI DISPERSIONE
ATTRAVERSO I TESSUTI MOLLI DI UN VACCINO SOMMINISTRATO
MEDIANTE NEEDLE FREE INJECTION DEVICE (NFID)
NELLA SPECIE SUINA.**

Introduzione

La vaccinazione è un fondamentale strumento di gestione strategica nel settore suinicolo intensivo. La vaccinazione rappresenta una voce di costo importante nella gestione e permette di contenere i problemi sanitari infettivi.

Negli ultimi anni i dispositivi di iniezione senza ago (Needle Free Injection Devices =NFID) stanno facendo la loro comparsa in ambito zootecnico, questi dispositivi utilizzano varie tecniche per la somministrazione di vaccini transcutanea senza aghi. Tra i benefici da evidenziare sono: risparmio di tempo, riduzione trasmissione tra animali di malattie, rispetto del benessere degli animali (tabella 1).

Vantaggi	Svantaggi
Diminuzione reazioni vaccinali avverse/lesioni ascessuali-granulomatose da vaccinazione	Elevati investimenti iniziali, costi elevati di esercizio
Dosaggio vaccinale standardizzato	Necessità di infrastrutture per la gestione di gas compressi e strumentazione
Diminuzione di volume vaccinale	Necessità di aggiornamento operatori
Maggior dispersione tissutale del vaccino	Mancata standardizzazione dei NFID per diversi prodotti vaccinali
Maggior sicurezza degli operatori	
Diminuzione costi di smaltimento aghi e taglienti	
Diminuito stress negli animali a seguito di contenimento e somministrazione vaccinale	
Diminuzione trasmissione iatrogena tra animali di patogeni	
Rapidità di esecuzione e minor richiesta di manodopera	

(Da Chase et al., 2008 Modificato)

Tabella 1: Vantaggi e svantaggi dei dispositivi NFID in campo zootecnico suinicolo.

Principio di funzionamento NFID con riferimento a quelli utilizzati in medicina veterinaria

Una jet injection generalmente crea un flusso estremamente sottile di fluido (farmaco) (figura 1) ad alta velocità (generalmente superiore a 100m/s) che penetra l'epidermide e consente una completa deposizione del farmaco nelle regioni cutanee o sottocutanee (Figge e Barnett, 1948; Bremseth e Pass, 2001; Schramm-Baxter e Mitragotri, 2002; Mitragotri, 2006). Le tre fasi di somministrazione di un vaccino con un NFID impiegano meno di 0,3 secondi (Chase *et al.*, 2008).

Il farmaco (vaccino, ormone od altro) può essere somministrato in sede intradermica, sottocutanea o intramuscolare modulando i parametri operativi del NFID. Gli elementi essenziali di un NFID sono: l'ugello, un serbatoio di farmaco ed un generatore di pressione (meccanico, elettrico o pneumatico) (Dyer, 2003) (figura 2).

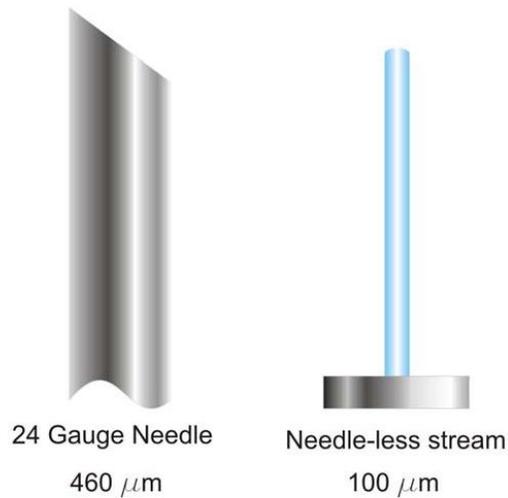


Figura 1: Confronto delle dimensioni di un ago 24G e del flusso di fluido originato da un NFID (ingrandimento 40X) (Dyer, 2003)

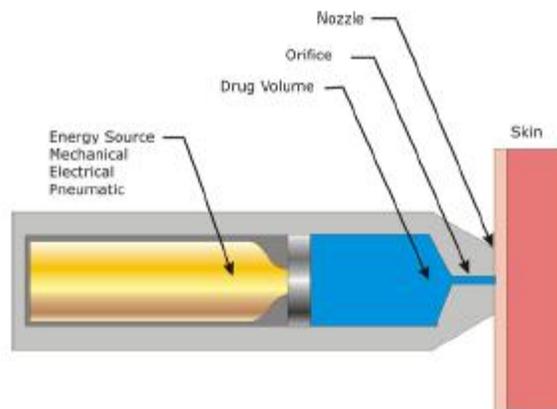


Figura 2: schematizzazione dei componenti di un NFID (Dyer, 2003)

E' noto come differenti combinazioni di velocità del flusso e diametri dell'ugello sono in grado di ottenere il medesimo pattern di dispersione. E' stato sviluppato il parametro exit jet power (P_0), legato al diametro dell'ugello, alla velocità del flusso (u), ed alla densità del fluido iniettato (ρ) (equazione 1). Tale parametro descrive la performance del NFID.

$$P_0 = \frac{\pi \rho D^2 u^3}{8}$$

Equazione 1 (da Mitragotri, 2006)

In commercio si trovano NFID caratterizzati da diametro dell'ugello variabili 76-360 μm ; le velocità del flusso sono generalmente superiori a 100m/s. Sono presenti due tipi di strumenti: quelli definiti multi-use nozzle jet injectors (MUNJI), e quelli disposable cartridge jet injectors (DCJI); i primi sono utilizzati ripetutamente ed i secondi presentano un componente (a contatto con la cute) usa e getta. In data odierna i primi sono utilizzati solo in ambito veterinario, sebbene anni addietro fossero stati impiegati largamente per vaccinazioni di massa in ambito umano (Mitragotri, 2006). Recentemente sono stati introdotti anche in ambito veterinario i DCJI (Chase *et al.*, 2008).

Modelli in vitro di dispersione di farmaci somministrati con NFID

La Letteratura offre numerosi risultati di trial clinici sull'utilizzo di NFID che utilizzano il metodo della jet injection, ma sono scarsi i dati che investigano gli eventi fisico-meccanici di tale modalità di somministrazione di farmaci (Schramm-Baxter *et al.*, 2004; Boom e Groenndijk, 2013; Ploemen *et al.*, 2014). Taluni studi sono stati condotti su ovini, bovini e suini, ma senza l'intento di valutare le caratteristiche ed i pattern della penetrazione/dispersione dei vaccini. Quasi tutti gli studi si sono focalizzati sulla efficacia di induzione dell'immunità o sulle conseguenze dei vari metodi di vaccinazione sulla carcassa, intesa come carne (Houser *et al.*, 2004; Colditz e Paull, 2010; Crow *et al.*, 2010; Gerlach *et al.*, 2012).

Un brillante trial è stato condotto da Schramm-Baxter e colleghi nel 2004, dove è stato utilizzato un gel al 20% di poliacrilammide trasparente che è stato sottoposto a jet injection con un NFID commerciale, utilizzando una soluzione di acqua deionizzata (0.076 ml) colorata con Sulfurodamina B (1.5mM). Le dinamiche della dispersione sono state monitorate e registrate con metodo fotografico ad alta velocità. (Schramm-Baxter *et al.*, 2004).

Il fenomeno fisico di penetrazione di un jet injection attraverso un gel di poliacrilamide riconosce tre fasi definite: erosione, stagnazione e dispersione (erosion, stagnation, and dispersion). La prima fase di erosione rappresenta la penetrazione del fluido attraverso il gel, e gran parte dell'energia cinetica viene dissipata; il fluido mostra una direzione di penetrazione verticale, con minime componenti laterali e la forma del tracciato (introductory channel) è cilindrica, alla fine di tale fase il 44% della profondità finale viene raggiunta. Si verifica quindi la fase di stagnation, dove non si verifica penetrazione. La terza fase, di dispersione, è la più duratura ed è caratterizzata da aumento di profondità e dispersione laterale, si può apprezzare una forma circolare del fluido (Figura 3). Gli autori poi sottolineano come questa modellizzazione non può essere quantitativamente comparata con la penetrazione cutanea, dove intervengono fenomeni di percolazione, ma suggeriscono come le fasi di

erosione e dispersione possano essere plausibilmente accettate come modelli a livello di cute (Schramm-Baxter *et al.*, 2004).

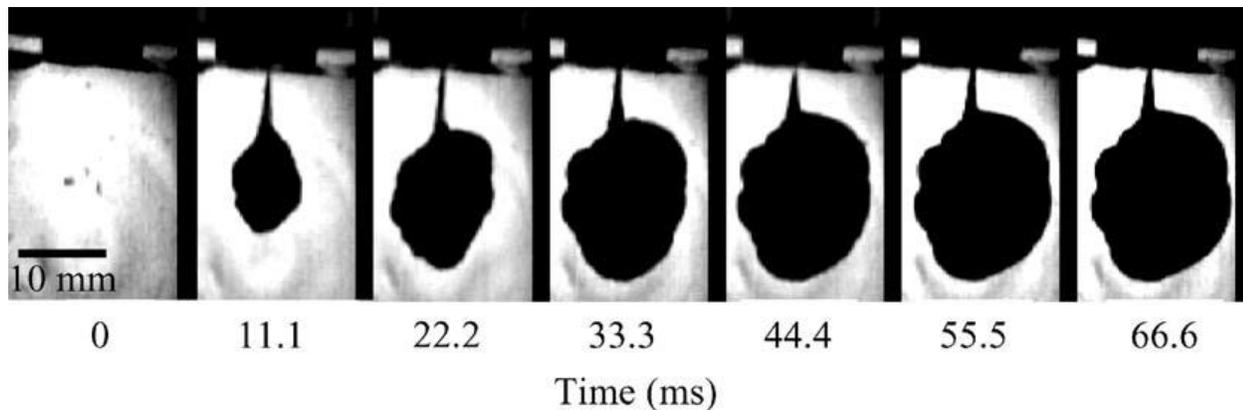


Figura 3: fasi della penetrazione di una jet injection in un gel di poliacrilamide al 20%. Si noti una fase di creazione di un introductory channel di forma cilindrica seguita da una fase di dispersione circolare (Schramm-Baxter *et al.*, 2004)

Le modellizzazioni fisico-biomeccaniche sono state effettuate in gel (poliacrilamide) mentre per comprendere i pattern di dispersione in vivo è necessaria una interpretazione dei tessuti adottando un punto di vista biomeccanico. Di seguito vengono presentati i tessuti molli della regione del collo seguendo un ordine stratigrafico anatomico, illustrandone le peculiarità istologiche, e biomeccaniche, tali elementi saranno poi usati per descrivere ed interpretare il trial.

Descrizione istologica stratigrafica e biomeccanica dei tessuti molli della specie suina

La cute nella specie suina

Descrizione istologica

La cute è formata da epidermide e derma. Lo spessore dell'epidermide in varie specie varia inversamente con la densità delle unità pilo-sebacee. Così il suino ha lo spessore dell'epidermide maggiore di tutte le specie animali domestiche, al pari dell'uomo. Si riconoscono diversi strati che formano l'epidermide, organo multistratificato ad elevato turnover. Lo spessore è di 30-140 μ e varia con la regione, lo spessore dell'epidermide umana è riportato essere di 10-120 μ . Dall'esterno verso l'interno, si riconoscono i seguenti strati: strato corneo (spessore variabile, a seconda della regione, 7-15 strati), strato lucido, strato granuloso, strato spinoso e strato basale, che poggia sulla membrana basale e si indica come giunzione dermo-epidermica. Tale interfaccia ha funzione di ancoraggio, andamento festonato e tale processi blandamente sinusoidali, in dermatologia vengono denominati *rete*

pegs, i quali si ingranano con i *rete ridges* del derma superficiale. Il derma si compone di due strati privi di demarcazione: uno strato superficiale papillare, ed uno profondo reticolare. Il rapporto tra spessore del derma e dell'epidermide nella specie suina è di circa 10:1-13:1 ed è simile a quello dell'uomo (Swindle *et al.*, 2012). Il derma mostra una bassa cellularità, esso è composto da un meshwork tridimensionali di fibre collagene intersecanti con direzione obliqua tra l'epidermide sovrastante ed il sottocute, sottostante. Oltre al collagene si identificano componenti amorfe macromolecolari quali glucosaminoglicani e molte fibre elastiche; queste componenti costituiscono la matrice extracellulare. Si identificano, sparsi nella matrice, un basso numero di fibroblasti, mastociti, macrofagi e plasmacellule. La componente vascolare si articola in tre plessi: un primo superficiale è detto subepidermico, quindi si ha un intermedio ed uno profondo. Il numero di capillari dermici oscilla tra 65-70/mm², ed è simile a quanto si riscontra nell'uomo.

Come già accennato, la densità di unità pilosebacee annessiali della cute suina è bassa, se paragonata a quella di altri animali, i peli sono organizzati in triadi e sono circa 11/cm² (Marcarian e Calhoun, 1966); tale densità è simile a quanto si riscontra nella specie umana. Il follicolo pilifero del suino contiene un muscolo follicolare, oltre al muscolo erettore del pelo. Si riscontrano sparse ghiandole apocrine e rare ghiandole eccrine; le ghiandole apocrine non contribuiscono alla termoregolazione, come nell'uomo (Swindle *et al.*, 2012)

Il sottocute, il sistema fasciale e muscolare nella specie suina

Descrizione istologica

Il sistema fasciale, dal punto di vista anatomico comparato, può essere definito come un organo (Willard *et al.*, 2012). Si riconoscono quattro tipi fondamentali di fasce, tra cui la prima è definita pannicolare o superficiale, che ricopre l'intero corpo, quindi si identifica la fascia profonda che avvolge il sistema muscoloscheletrico. La terza fascia è meningea e ricopre il sistema nervoso centrale; infine si riconosce la fascia viscerale o splanchnica che avvolge le cavità corporee e gli organi in esse contenute (Willard *et al.*, 2012). Gli strati fasciali possono essere visualizzati come strati concentrici (Willard *et al.*, 2012). Di seguito saranno trattate le fasce superficiale e profonda.

Il sottocute o fascia superficiale o ipoderma è formato da tessuto connettivo lasso che delimita, con setti di fibre collagene frammisto a scarsa elastina, lobuli di adipociti (fat chambers). L'ammontare del tessuto adiposo è variabile in base alla topografia. Il collagene è orientato perpendicolarmente alla superficie cutanea ed origina dal derma reticolare (Marcarian e Calhoun, 1966). Si identificano inoltre

vasi ematici e linfatici e tronchi nervosi. La fascia superficiale consente la mobilità della cute sui piani sottostanti.

Al di sotto della fascia superficiale, si riconosce la fascia profonda che è in continuità con l'epimisio. La struttura della fascia profonda riconosce tre lamine, tra le quali è interposta un'esigua quantità di tessuto adiposo. La fascia, facilmente separabile dal tessuto muscolare, risulta avere connessioni con l'epimisio sottostante solo in alcune regioni tramite setti fibrosi. Le lamine sono composte da fibrille collagene a vari orientamenti (Willard *et al.*, 2012).

L'apparato muscolare scheletrico della specie suina è imponentemente sviluppato, e raramente viene utilizzato come animale modello in ricerca biomedica, a differenza delle affinità dell'istoarchitettura cutanea, che ne fanno un robusto modello della cute umana (Swindle *et al.*, 2012). Sono numerosi invece gli studi che caratterizzano la componente muscolare del suino intesa come prodotto carneo (Fang *et al.*, 1999; Nishimura, 2010).

Dal punto di vista istologico, il muscolo scheletrico è unico, ogni miofibra è un sincizio che si è formato durante la miogenesi dalla fusione di centinaia o migliaia di mioblasti individuali. Si tratta di cellule ad elevata specializzazione, giacché l'80% del volume mioplasmatico è occupato da fibrille contrattili. Le fibrille contrattili, responsabili della bandeggiatura regolare in sezione trasversale, si organizzano in serie lungo tutta la lunghezza della miofibra. La singola unità contrattile viene definita sarcomero. In sezione trasversale il muscolo mostra un caratteristico aspetto a mosaico che può venire accentuato da colorazioni istoenzimatiche.

Il tessuto connettivo interstiziale viene diviso in epimisio (avvolge un muscolo intero), perimisio (avvolge fascicoli di notevoli dimensioni ulteriormente divisi in fascicoli primari di 10-100 miofibre) e quindi l'endomisio che avvolge ogni singola miofibra.

Caratteristiche biomeccaniche dei tessuti molli

I materiali biologici sono caratterizzati e composti da una componente solida e da una componente fluida/liquida; da ciò deriva che quando ricevono una sollecitazione meccanica manifestano un comportamento fisico viscoso ed elastico; tale proprietà viene definita viscoelasticità ed i tessuti sono definiti viscoelastici (Sasaki, 2012).

Le proprietà viscoelastiche dei tessuti sono determinate primariamente dal tipo di matrice extracellulare. Tale matrice può essere definita come un insieme di proteine secrete da cellule, primariamente fibroblasti, depositate nello spazio extracellulare.

A livello di cute, le caratteristiche biomeccaniche sono date dal derma. La proteina dermica più abbondante è rappresentata dal collagene, che nella specie umana rappresenta più del 75% sulla sostanza secca. Si riconosce quindi l'elastina, proteina caratterizzata da notevole capacità di deformazione se sottoposta a stress meccanico. L'elastina nel derma reticolare si dispone orizzontalmente, mentre nel derma papillare mostra una disposizione verticale, a palizzata. Quindi si identifica la componente amorfa, rappresentata dai glucosaminoglicani (GAG), tra cui si identifica dermatan-solfato, condroitin solfato, ialuronano che sono macromolecole amorphe ad elevata idratazione e presenti sottoforma di gel. Si ritiene che l'organizzazione architettonica della componente collagena ed elastica sia ordinata, e i GAG vanno a riempire gli spazi tra le due precedenti. La conseguenza biomeccanica di tale architettura, oltre alla viscoelasticità, è l'anisotropia. L'anisotropia è la proprietà meccanica in base alla quale le proprietà fisiche dipendono dalla direzione di propagazione o applicazione delle forze (Bosboom *et al.*, 2001).

Il tessuto adiposo mostra un comportamento viscoelastico (Geerligts *et al.*, 2008).

Il tessuto muscolare è non omogeneo, anisotropo e dimostra proprietà non lineari viscoelastiche (Bosboom *et al.*, 2001). La componente solida del muscolo si comporta in modo elastico, ed è in grado di subire una deformazione, mentre la componente fluida può deformarsi in modo continuo se sottoposta ad una forza applicata per un periodo prolungato. La conseguenza di queste due proprietà fisiche è che il muscolo scheletrico ha una risposta tempo dipendente che è legata alla velocità di applicazione o rimozione del carico. Le proprietà viscoelastiche del muscolo scheletrico si spiegano considerando la struttura microscopica del muscolo stesso: le miofibrille contrattili rappresentano componenti elastiche in serie, il plasmalemma e la fascia sono da considerarsi componenti elastiche in parallelo, con una composizione biochimica specifica (Mutungi e Ranatunga, 1996).

I tessuti molli del nostro corpo sono, collettivamente, strutture composite e complesse. Il loro comportamento biomeccanico è fortemente influenzato dalla concentrazione e la disposizione strutturale dei costituenti, come il collagene e l'elastina, la matrice di proteoglicani idratata, ma anche la topografia.

Obiettivi

Il presente studio si è proposto di valutare, mediante metodologia quantitativa ed analisi di immagine, il pattern di dispersione di un vaccino nei tessuti molli di suinetti, che sono stati sottoposti a vaccinazione mediante uno strumento NFID. In particolare si è voluto indagare se lo strumento NFID, testato a tre

pressioni di esercizio, era in grado di somministrare in ambito intramuscolare un vaccino specificatamente registrato per la somministrazione intramuscolare.

Trial design

Lo studio è stato diviso in quattro fasi, una per ciascun gruppo di suinetti con tre sotto fasi: la prima di somministrazione del vaccino mediante NFID, la seconda di congelamento, ottenimento di sezioni trasversali ed acquisizione di scansioni di dette sezioni, la terza di analisi ed elaborazione digitale delle immagini acquisite.

Animali

Sono stati utilizzati 48 suinetti convenzionali divisi in quattro gruppi (n=12 per gruppo) per fascia di peso (4-5 Kg, 6-7 Kg, 8-10 Kg e 15-20 Kg) e in ciascun gruppo sono stati divisi in tre sottogruppi (n=4) omogenei e sottoposti a vaccinazione con il NFID a 3 regimi pressori (2, 4, 6). Gli animali sono stati marcati, sottoposti ad esame clinico all'arrivo e prima della somministrazione del vaccino. I suinetti sono stati alloggiati in una gabbia su grigliato (2.7X3 m) con disponibilità acqua ad libitum e lampada a raggi infrarossi. Gli animali sono stati assegnati ai tre trattamenti (regimi pressori NFID) con procedura di randomizzazione. Dopo la vaccinazione i suinetti sono stati sottoposti ad eutanasia in accordo con il seguente protocollo farmacologico 0.4 ml IM di Tiletamina+Zolazepam IM (Zoletil® Virbac, FR) dopo 15 minuti, 3 ml di Pentothal IV e 3 ml di Tanax® IV (MSD Anim Health Srl-Italia). Successivamente le carcasse sono state congelate in posizione verticale con muso sollevato (48 h; -20°C), per ottenere simmetria bilaterale ed afflusso ipostatico del sangue nel treno posteriore.

NFID e vaccinazione

E' stato utilizzato un NFID denominato Valery © (Giordano Poultry Plast SPA) alle tre pressioni di esercizio denominate 2, 4, 6 (settaggio del NFID). E' stato utilizzato un vaccino commerciale al dosaggio raccomandato di 0,5 ml (Circovac® -Merial, Lyon, France). Per permettere la visualizzazione della dispersione a livello di tessuti molli, il vaccino è stato addizionato con inchiostro di china nera (Pelikan™), in ragione di 1 ml di inchiostro in 100 ml di vaccino ricostituito. Il vaccino è stato somministrato nella regione della cosiddetta "fossetta retroauricolare" sinistra. Il sito di inoculo è stato marcato immediatamente dopo la vaccinazione con pennarello nero indelebile resistente al congelamento (Snowman, Seiko Seisakusho Co.,Ltd., Japan). La presenza di emorragia immediatamente dopo la vaccinazione è stata espressa come percentuale di soggetti con emorragia per

ciascun sottogruppo. Successivamente all'acquisizione delle immagini ed allo scongelamento, i soggetti sono stati sottoposti ad un esame *post-mortem*.

Scanner photography ed analisi di immagine

Sono state ottenute dalle carcasse tre sezioni seriali di spessore di 1 cm circa, e tali sezioni sono state scansionate con uno scanner piano (flatbed scanner) (hp-Hewlett-Packard Company 3000 Hanover Street Palo Alto, CA) dotato di schermi di vetro protettivo suppletivo intercambiabile. Si è proceduto alla sezione trasversale del sito di somministrazione del vaccino e di una sezione craniale e caudale ad esso di spessore pari ad 1 cm. Sono state acquisite immagini digitali in formato JPEG, 10200X14040 pixel, 24bit, 465 pixel/cm (Bianco e Vila, 2014). Le immagini sono state successivamente analizzate con imagej (<http://imagej.nih.gov/ij/>). In particolare, la massima profondità di penetrazione (S) dalla superficie cutanea è stata misurata manualmente ed espressa in centimetri, tracciando una linea ortogonale alla cute. Si sono identificate le misure lineari e le percentuali di coinvolgimento degli strati dermico-fasciale superficiale (D) ed intermuscolare-fasciale profondo (M) ed espressi come misura lineare (cm) e percentuale (%), per ciascuna sezione. La misura lineare rappresenta il punto di massima profondità, mentre la percentuale esprime la ripartizione tra strato D ed M (se non è stata apprezzata/misurata dispersione nel comparto D, ma è stata osservata dispersione in M, il 100% della dispersione è muscolare, se si apprezza dispersione in D ed M, viene calcolata la percentuale sulla misura lineare di coinvolgimento di D ed M, se si apprezza dispersione unicamente in D, il 100% della dispersione è dermica). Sono stati misurati i perimetri e le aree delle dispersioni dermico-fasciale superficiale ed intermuscolare-fasciale profondo per ciascuna sezione ed espressi in centimetri perimetro e centimetri quadrati (area). E' stato in seguito ricavato il logaritmo in base 10 del rapporto perimetro/area della dispersione vaccinale bidimensionale per ciascuna sezione. La presenza di emorragia è stata codificata con variabile dicotomica (1=presenza; 0=assenza); la presenza di altre lesioni è stata codificata con variabile dicotomica (1=presenza; 0=assenza).

Analisi statistica

La distribuzione dei dati è stata saggiata con il test di Shapiro-Wilk. I dati con distribuzione non normale indipendenti sono stati analizzati con test di Kruskal-Wallis nel caso di confronti multipli, i confronti a coppie sono stati svolti con test di Mann-Whitney. I dati con distribuzione non normale non indipendente sono stati comparati, in caso di confronti multipli, con test di Friedman ANOVA. I dati con distribuzione non normale non indipendente sono stati comparati, in caso di confronti a coppie, con

test di Wilcoxon. I dati con distribuzione normale indipendenti sono stati comparati con Anova e post-hoc (confronti multipli) o test t student; i dati con distribuzione normale non indipendenti sono stati analizzati con test t student per dati appaiati. Le frequenze e le proporzioni sono state saggiate con test del Chi-Quadrato. La significatività è stata settata con $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata effettuata con il software SPSS20 (IBM Statistics). I grafici sono stati costruiti con il software statistico Statistica8 (Statsoft).

Risultati

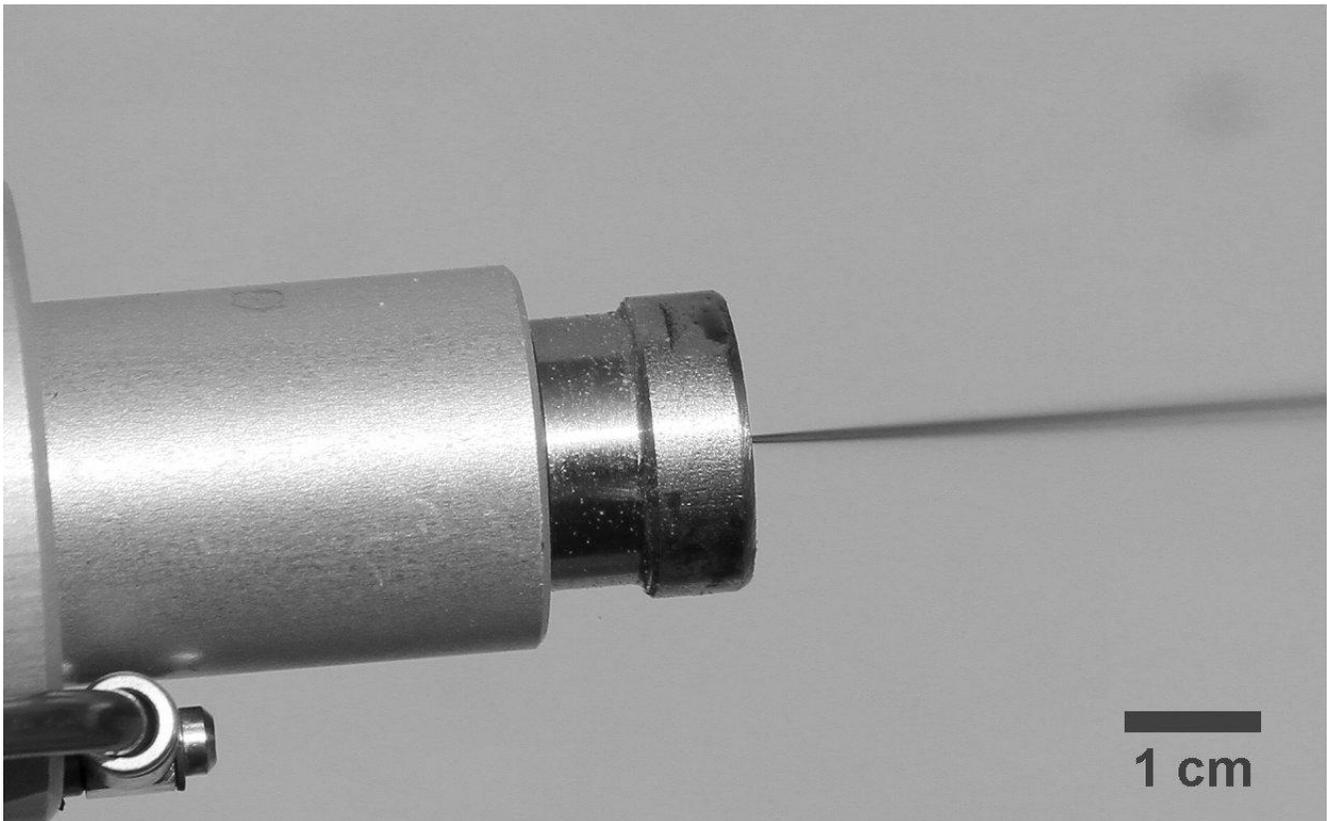


Figura 4: Dispositivo NFID Valery© in fase di jet injection di vaccino (0,5 ml) colorato con inchiostro di china, si noti il flusso lineare estremamente sottile in prossimità dell'ugello. (high speed photography: esposizione 1/1250 s)

Prova *in vivo*

Gli animali all'arrivo erano clinicamente sani. Il confronto delle medie dei pesi dei sottogruppi entro ciascun gruppo condotto mediante ANOVA ad una via con test post hoc LSD non ha rilevato differenze significative ($p > 0,05$). Il confronto del rapporto tra sessi non ha rilevato differenze significative (Chi-quadrato=10,00; $p=0,53$). Il confronto della frequenza delle emorragie esterne post somministrazione vaccinale tra i vari regimi pressori non ha rivelato significatività statistica (Chi-Quadrato=2,25; $p=0,69$). I dati tabulati sono riportati in tabella 2.



Figura 5: Somministrazione di vaccino addizionato di inchiostro di china nella regione retroauricolare sinistra, mediante NFID (suinetta femmina n2, 4,05 kg, gruppo 1, sottogruppo 1, pressione di inoculo=2; dosaggio=0,5 ml).

Tabella 2: tavola sinottica della fase *in vivo*.

Gruppo	Sottogruppo	Peso vivo (media±DS)	Maschi castrati	Femmine	Numerosità	Pressione NFID	Emorragia esterna
1	1	4,78±0,71	2	2	4	2	0/4
1	2	5,43±0,80	3	1	4	4	0/4
1	3	4,82±0,61	2	2	4	6	0/4
2	4	6,32±0,38	4	0	4	2	2/4
2	5	6,35±0,42	2	2	4	4	0/4
2	6	6,82±0,96	3	1	4	6	2/4
3	7	9,51±1,15	2	2	4	2	0/4
3	8	9,95±0,42	2	2	4	4	0/4
3	9	8,97±0,71	1	3	4	6	0/4
4	10	17,91±1,05	1	3	4	2	1/4
4	11	17,81±1,23	1	3	4	4	2/4
4	12	18,17±1,38	1	3	4	6	0/4

Descrizione macroscopica dei pattern di dispersione del vaccino somministrato mediante NFID

Sono stati riscontrati due pattern di dispersione diversi a livello di compartimento dermico-fasciale superficiale (D) ed intermuscolare-fasciale profondo. Inoltre la S2 (sezione trasversale ottenuta a livello di iniezione del vaccino colorato, era più di frequente coinvolta da dispersione coinvolgente lo strato D. Il primo pattern di dispersione (D) era focale e localizzato, aveva la forma vagamente circolare irregolare, era omogeneamente nerastra a margini netti (figura 7a). Il secondo pattern di dispersione (M) era retiforme, o irregolarmente lineare talvolta discontinuo, intensamente nerastro, a carico dei compartimenti interfasciali intermuscolari e raramente si apprezzava colorazione nerastra nei ventri muscolare (figura 7a). Il vaccino iniettato disegnava l'andamento dei profili epimisiali in sezione trasversale e multifocalmente oscurava il tessuto adiposo intermuscolare fasciale profondo.

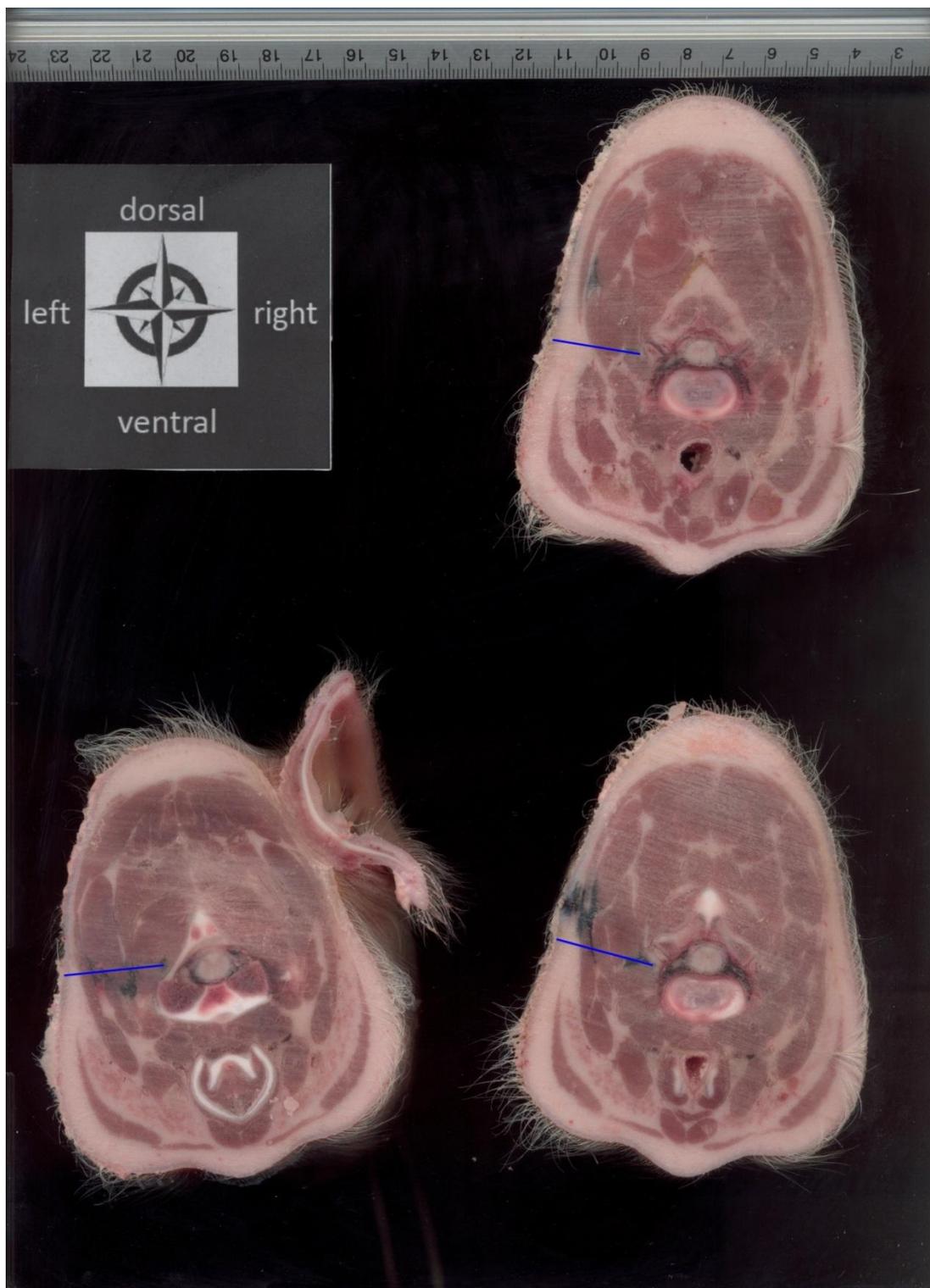


Figura 6: Scanner-Photography. In alto a destra S3, in basso a destra S2 (sito di inoculo), in basso a sinistra, S1. Esempio di misura lineare della massima profondità di penetrazione (suinetto castrato n22, 5,9 kg, gruppo 2, sottogruppo 6, pressione di inoculo=6; dosaggio=0,5 ml).

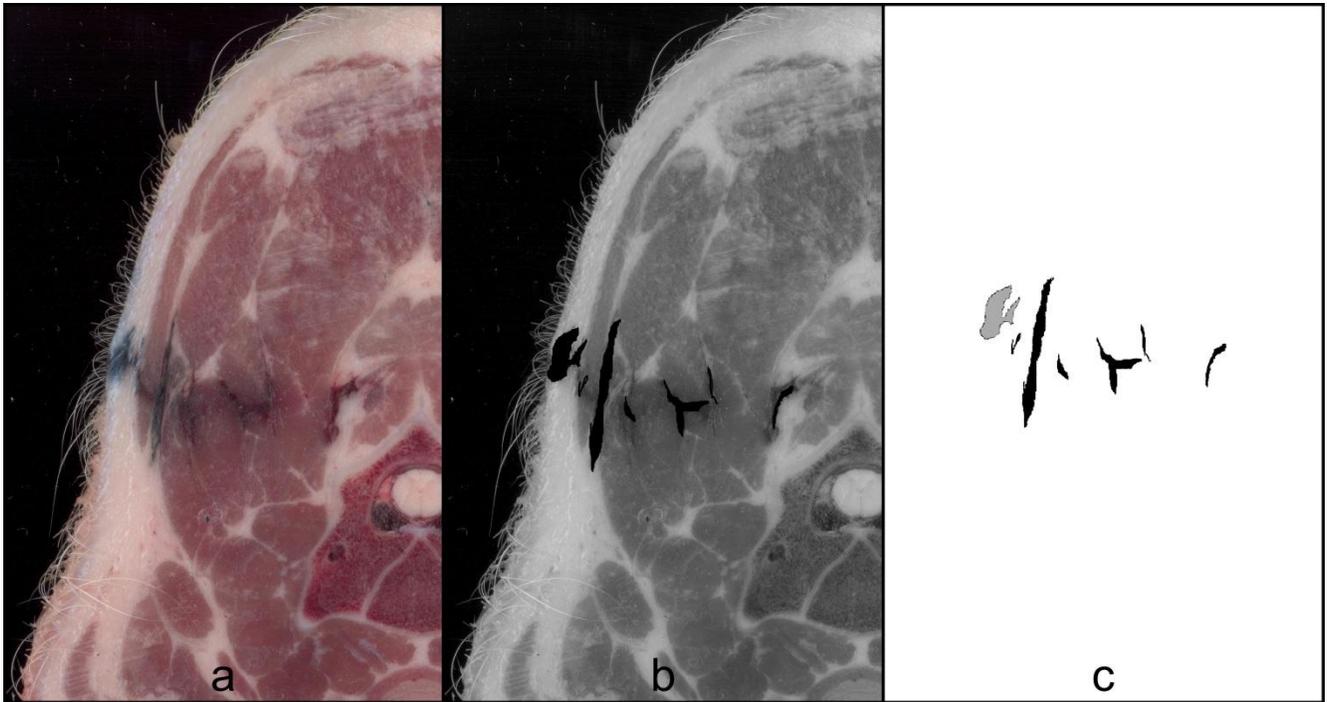


Figura 7: esempio di analisi di immagine ed ottenimento delle aree i perimetri e le aree delle dispersioni dermico-fasciale superficiale ed intermuscolare-fasciale. a: particolare sezione S2 suinetto n43, femmina, 18,0 kg, gruppo 4, sottogruppo 11, pressione 4) b esempio di selezione manuale aree di dispersione. c: grigio: area di dispersione dermico-fasciale superficiale ($\log_{10}p/A= 1,35$); nero: dispersione dermico-fasciale superficiale ($\log_{10}p/A= 1,57$)

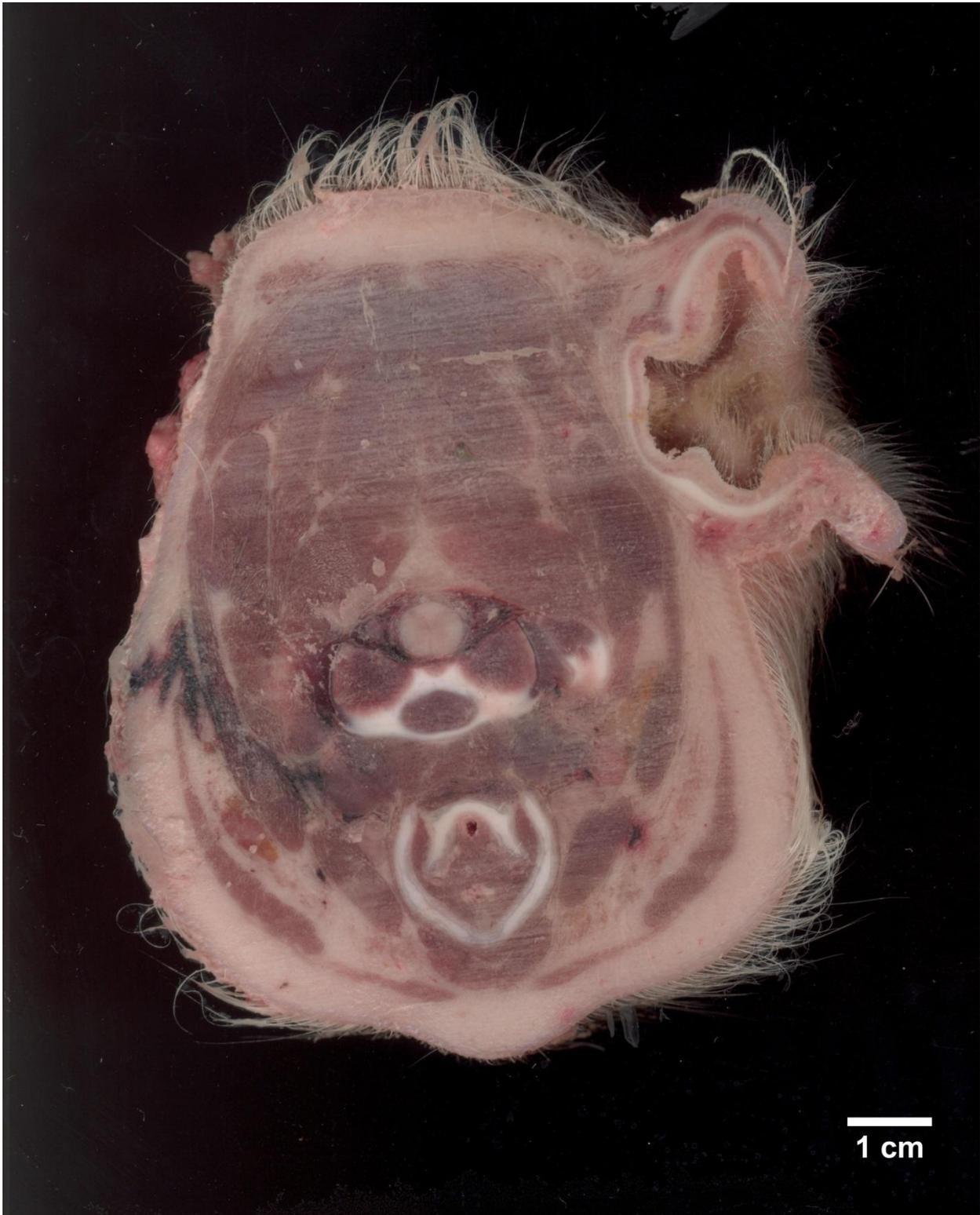


Figura 8: Scanner-Photography; emorragia dermico-fasciale superficiale in S2 (sito di inoculo). Suino n4, femmina, 5,75 kg, gruppo 1, sottogruppo 1, pressione 2.

Tabella 3: tavola sinottica dei risultati quantitativi (statistiche descrittive) dell'analisi di immagine: profondità assoluta di penetrazione del vaccino e ripartizione lineare e percentuale. (pagina seguente)

G	SG	P	1S * (cm)	1D* (cm)	1M* (cm)	2S** (cm)	2 D* (cm)	2M** (cm)	3S** (cm)	3D* (cm)	3M* (cm)	1 D* (%)	1M (%)	2D* (%)	2M* (%)	3D* (%)	3M* (%)
1	1	2	1,67 (0,97-2,30)	0,59 (0,00-0,74)	1,08 (0,35-1,56)	2,20±0,4 2	0,65 (0,52-0,80)	1,54±0,3 9	1,08±0,9 9	0,56 (0,00-0,64)	0,52 (0,00-1,53)	37,29 (0,00-63,84)	62,70 (36,16-100,00)	28,14 (25,00-40,48)	71,85 (59,52-75,00)	68,10 (9,49-100,00)	31,90 (0,00-70,51)
1	2	4	1,19 (0,00-2,72)	0 (0,00-0,77)	0,50 (0,00-1,95)	2,42±0,2 1	0,53 (0,00-0,65)	1,82±0,1 8	1,85±0,6 6	0,00 (0,00-0,55)	1,08 (0,92-2,06)	14,15 (0,00-100,00)	85,84 (0,00-100,00)	23,59 (0,00-49,53)	76,40 (50,47-100,00)	0,00 (0,00-21,07)	100,00 (78,93-100,00)
1	3	6	1,14 (0,00-2,66)	0,00 (0,00-0,52)	0,53 (0,00-2,14)	1,90±0,4 9	0,48 (0,00-0,67)	1,36±0,5 3	1,92±0,3 2	0,00 (0,00-0,00)	1,42 (1,01-1,77)	9,77 (0,00-100,00)	90,22 (0,00-100,00)	27,41 (0,00-43,51)	72,58 (56,49-100,00)	0,00 (0,00-0,00)	100,00 (100,00-100,00)
2	4	2	2,19 (1,06-2,82)	0,00 (0,00-0,56)	1,70 (0,50-2,11)	2,21±0,8 7	0,71 (0,67-0,71)	1,51±0,8 9	2,05±0,6 1	0,00 (0,00-0,00)	1,66 (0,77-1,78)	0,00 (0,00-52,83)	100,00 (47,17-100,00)	43,08 (23,93-100,00)	73,00 (40,83-76,07)	0,00 (0,00-0,00)	100,00 (100,00-100,00)
2	5	4	2,23 (1,92-2,55)	0,00 (0,00-0,00)	1,71 (1,57-2,11)	1,80±0,2 8	0,50 (0,27-0,77)	1,29±0,4 6	1,13±0,1 4	0,00 (0,00-0,56)	0,6 (0,55-0,76)	0,00 (0,00-0,00)	100,00 (100,00-100,00)	30,59 (12,06-45,03)	69,40 (54,97-87,94)	0,00 (0,00-42,42)	100,00 (57,58-100,00)
2	6	6	2,36 (1,44-2,82)	0,00 (0,00-0,00)	1,91 (0,65-2,20)	1,99±0,4 4	0,26 (0,00-0,53)	1,53±0,3 5	1,02±1,4 4	0,00 (0,00-0,00)	0,85 (0,00-1,70)	0,00 (0,00-0,00)	100,00 (100,00-100,00)	28,91 (0,00-38,14)	71,09 (61,86-100,00)	50,00 (0,00-100,00)	100,00 (0,0-100,00)
3	7	2	1,18 (0,00-2,36)	0,00 (0,00-0,00)	0,8 (0,00-1,86)	1,78±0,5 2	0,41 (0,37-0,48)	1,36±0,4 9	2,06±0,6 7	0,00 (0,00-0,41)	1,38 (1,20-2,29)	0,00 (0,00-100,00)	100,00 (100,00-100,00)	26,66 (20,67-100,00)	79,22 (67,46-79,33)	0,00 (0,00-26,28)	100,00 (73,72-100,00)
3	8	4	1,31 (0,00-2,80)	0,00 (0,00-0,33)	0,87 (0,00-2,20)	1,51±0,4 1	0,42 (0,00-0,53)	1,04±0,4 3	1,88±0,2 1	0,00 (0-0,49)	1,41 (1,15-1,73)	41,25 (0,00-100,00)	58,75 (0,00-100,00)	24,12 (0,00-33,78)	75,88 (66,22-100,00)	0,00 (0,00-28,82)	100,00 (71,18-100,00)
3	9	6	0,00 (0,00-2,38)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-1,90)	0,84±0,5 9	0,21 (0,00-0,44)	0,52±0,4 0	1,20±0,1 8	0,4 (0,00-0,43)	0,87 (0,53-0,97)	100,00 (0,00-100,00)	0,00 (0,00-100,00)	42,85 (0,00-100,00)	57,14 (0,00-100,00)	31,69 (0,00-44,79)	68,30 (55,21-100,00)
4	10	2	0,84 (0,00-3,43)	0,00 (0,00-0,00)	0,48 (0,00-3,13)	1,66±1,3 7	0,34 (0,00-0,55)	1,35±1,2 6	1,93±1,4 4	0,22 (0,00-0,54)	1,3 (0,06-3,55)	50,00 (0,00-100,00)	50,00 (0,00-100,00)	27,95 (9,23-100,00)	72,05 (0,00-90,77)	12,61 (0,00-29,61)	87,38 (70,39-100,00)
4	11	4	2,19 (1,20-3,00)	0,00 (0,00-0,00)	1,50 (0,83-2,34)	3,07±0,3 3	0,13 (0,00-0,33)	2,70±0,4 6	3,56±0,6 1	0,00 (0,00-0,00)	3,31 (2,54-4,03)	0,00 (0,00-0,00)	100,00 (100,00-100,00)	4,06 (0,00-10,06)	95,93 (89,94-100,00)	0,00 (0,00-0,00)	100,00 (100,00-100,00)
4	12	6	0,93 (0,00-2,13)	0,00 (0,00-0,00)	0,69 (0,00-1,59)	1,59±1,6 4	0,17 (0,00-0,48)	1,28±1,5 4	2,70±0,8 1	0,00 (0,00-0,41)	2,52 (1,04-2,97)	50,00 (0,00-100,00)	50,00 (0,00-100,00)	57,41 (0,00-100,00)	42,58 (0,00-100,00)	6,06 (0,00-100,00)	100,00 (87,87-100,00)

Legenda: G: gruppo; SG: sottogruppo; P: pressione; S: sezione; D: compartimento dermico-fasciale superficiale; M: intermuscolare-fasciale profondo;

*dati con distribuzione non normale, vengono presentate le mediane, il massimo ed il minimo.

**dati con distribuzione normale, vengono presentate le medie e la deviazione standard (DS)

Tabella 4: tavola sinottica dei risultati qualitativi (statistiche descrittive) dell'analisi di immagine. Presenza di emorragia ed altre lesioni nelle tre sezioni e nei due compartimenti stratigrafici

G	SG	P	1DH	1MH	2DH	2MH	3DH	3MH	altro
1	1	2	1/4	0/4	2/4	0/4	1/4	0/4	0/4
1	2	4	0/4	0/4	3/4	1/4	1/4	2/4	0/4
1	3	6	0/4	2/4	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4
2	4	2	0/4	1/4	1/4	1/4	0/4	1/4	1/4
2	5	4	0/4	3/4	3/4	3/4	0/4	0/4	0/4
2	6	6	0/4	1/4	3/4	2/4	1/4	2/4	0/4
3	7	2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4
3	8	4	0/4	0/4	3/4	2/4	0/4	0/4	1/4
3	9	6	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4	0/4
4	10	2	0/4	0/4	1/4	1/4	0/4	1/4	0/4
4	11	4	0/4	2/4	0/4	1/4	0/4	2/4	0/4
4	12	6	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	0/4

Legenda: G: gruppo; SG: sottogruppo; P: pressione; DH: emorragia presente nel compartimento dermico-fasciale superficiale MH: compartimento intermuscolare-fasciale profondo; altro: lesioni incidentali.

Il confronto della misura lineare di massima profondità di penetrazione del vaccino (S), delle misure lineari del coinvolgimento degli strati dermico-fasciale superficiale (D) ed intermuscolare-fasciale profondo (M), condotto mediante test di Kruskal-Wallis con confronti multipli non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i tre livelli pressori adottati.

Il confronto delle percentuali di coinvolgimento degli strati dermico-fasciale superficiale (D) ed intermuscolare-fasciale profondo (M), condotto mediante test di Kruskal-Wallis con confronti multipli non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i tre livelli pressori adottati.

Il confronto delle percentuali di coinvolgimento degli strati dermico-fasciale superficiale (D%), confrontando le tre sezioni seriali, condotto mediante test di Friedman ANOVA per confronti multipli di dati non indipendenti, ha rivelato differenze statisticamente significative ($p=0,00077$) (Grafico 1-a).

Il confronto delle percentuali di coinvolgimento degli strati dermico-fasciale superficiale (D%), confrontando i valori D1%, D2% e D3% a coppie, condotto mediante test di Wilcoxon, ha rivelato una differenza statisticamente significativa tra D2% e D3% ($p= 0,003903$).

Il confronto delle percentuali di coinvolgimento degli strati intermuscolare-fasciale profondo (M1%; M2%, M3%), confrontando le tre sezioni seriali, condotto mediante test di Friedman ANOVA per confronti multipli di dati non indipendenti, ha rivelato differenze statisticamente significative ($p=0,00051$) (Grafico 1-b). Il confronto delle percentuali di coinvolgimento degli strati intermuscolare-fasciale profondo (M), confrontando i valori M1%, M2% e M3% a coppie, condotto mediante test di Wilcoxon, ha rivelato una differenza statisticamente significativa tra M2% e M3% ($p= 0,001040$) e tra M1% e M3% ($p=0,022542$). Il confronto della frequenza delle emorragie degli strati dermico-fasciale superficiale (DH) e intermuscolare-fasciale profondo (MH), condotto mediante test del Chi-quadrato, non ha rivelato differenze significative tra i tre diversi regimi pressori adottati (tabella 4). Il confronto della frequenza delle emorragie degli strati dermico-fasciale superficiale (DH) e intermuscolare-fasciale profondo (MH), condotto mediante test del Chi-quadrato, ha rivelato differenze significative tra i quattro gruppi (G) di suinetti di peso diverso per quanto riguarda l'emorragia dermica della sezione 2 (sede di inoculo) (2DH) (Chi-quadrato=13,878; $p=0,003$). (Frequenze 2DH: G1=75%; G2=63,63%; G3=27,27%; G4=8,33%) (tabella 4).

Il confronto della frequenza delle lesioni incidentali (ascessi), condotto mediante test del Chi-quadrato, non ha rivelato differenze significative tra i gruppi, i sottogruppi ed i diversi regimi pressori adottati (tabella 4)

Il confronto dei logaritmi in base 10 del rapporto perimetro/area della dispersione vaccinale bidimensionale per ciascuna sezione, condotto mediante test di Kruskal-Wallis con confronti multipli non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i tre livelli pressori adottati.

Il confronto dei logaritmi in base 10 del rapporto perimetro/area (shape metric) della dispersione vaccinale bidimensionale, confrontando i valori della dispersione dermica ($\log_{10} p/A$) e muscolare ($\log_{10} p/A$) a coppie senza considerare le singole sezioni, condotto mediante test di Wilcoxon, ha rivelato differenze statisticamente significative ($p=0,00000$; dispersione dermica-fasciale superficiale $\log_{10} p/A$ mediana= 1,24; min=0,89 max=2,05; dispersione muscolare interfasciale profonda $\log_{10} p/A$ mediana= 1,70 min=0,16 max=1,98) (grafico 2). Il confronto dei valori della dispersione dermica ($\log_{10} p/A$) e muscolare ($\log_{10} p/A$) a coppie confrontando le sezioni, condotto mediante test di Wilcoxon, ha rivelato differenze statisticamente significative nella sezione 2 ($p=0,000001$; dispersione dermica-fasciale superficiale $\log_{10} p/A$ mediana= 1,18; min=0,89 max=1,75; dispersione muscolare interfasciale profonda $\log_{10} p/A$ mediana=1,72; min=0,89 max=1,97). (grafico 2).

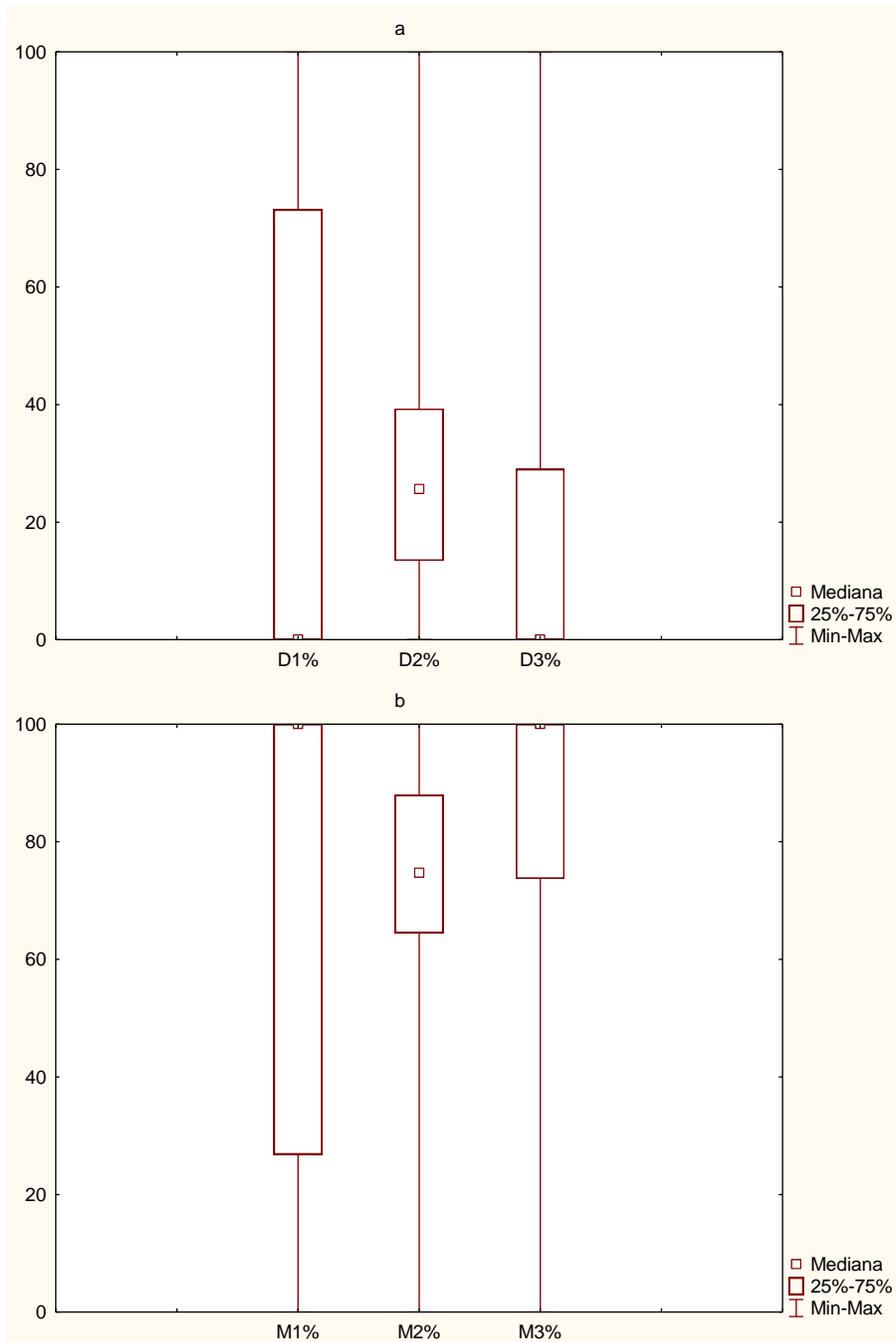


Grafico 1a percentuali di coinvolgimento degli strati dermico-fasciale superficiale (D1%; D2%;D3%), confrontando le tre sezioni seriali. (test di Wilcoxon, D2% e D3% ($p= 0,003903$)). **1 b** percentuali di coinvolgimento degli strati intermuscolare-fasciale profondo (M1%; M2%, M3%), confrontando le tre sezioni seriali. Si noti l'andamento opposto dei due grafici, si noti il maggiore coinvolgimento degli strati dermico-fasciale superficiale nella sezione 2 (sito di inoculo). (test di Wilcoxon, M2% e M3% ($p= 0,001040$) e tra M1% e M3% ($p=0,022542$)).

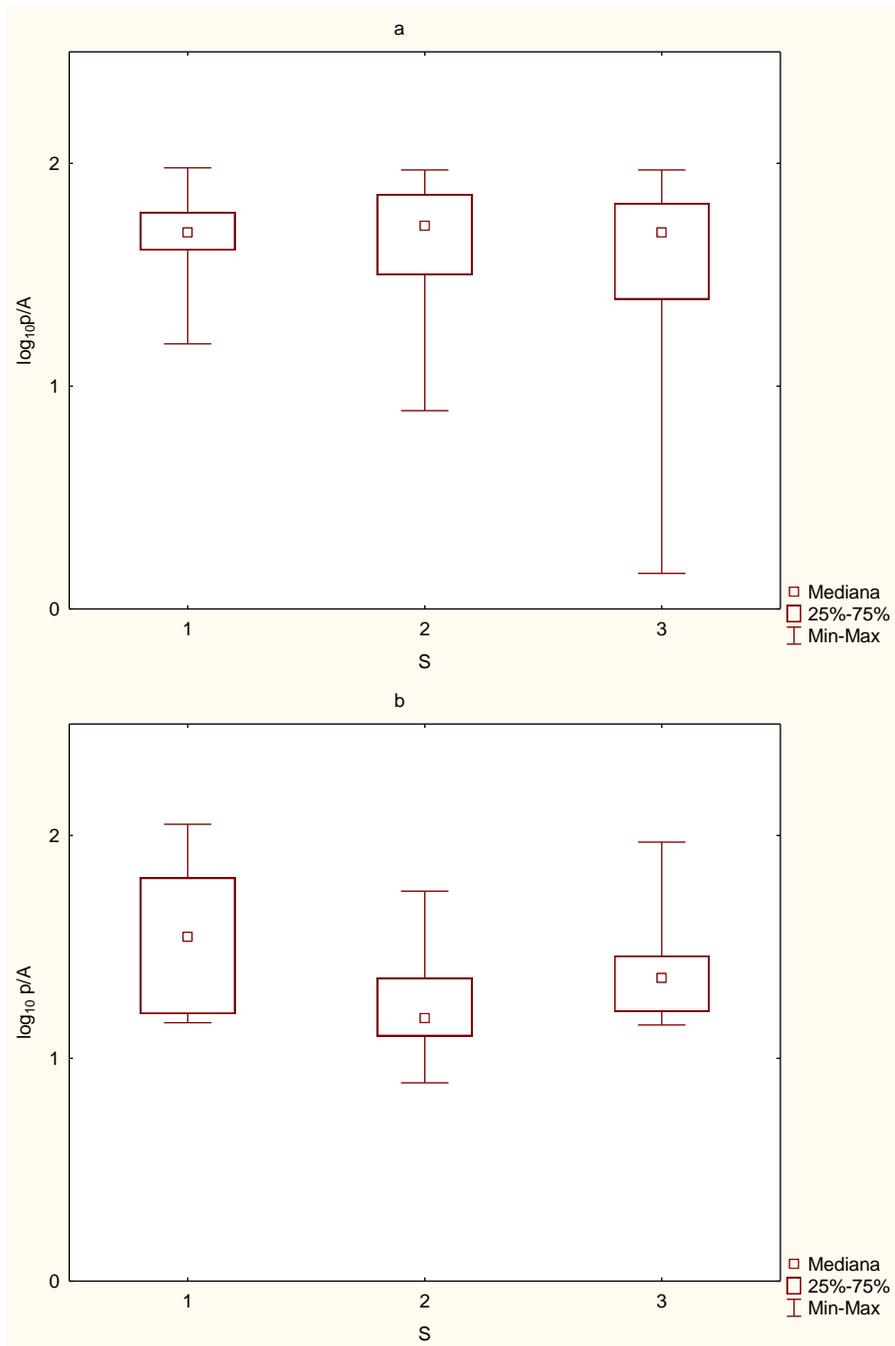


Grafico 2a confronto dei logaritmi in base 10 del rapporto perimetro/area (shape metric) della dispersione vaccinale bidimensionale per ciascuna sezione, confrontando i valori della dispersione dermica ($\log_{10} p/A$), confrontando le tre sezioni seriali. **2b** confronto dei logaritmi in base 10 del rapporto perimetro/area (shape metric) della dispersione vaccinale bidimensionale per ciascuna sezione, confrontando i valori della dispersione muscolare ($\log_{10} p/A$) confrontando le tre sezioni seriali.

Discussione

I vari momenti di analisi di immagine hanno affrontato il lavoro per raggiungere gli obiettivi mediante una misura lineare prima, con una successiva caratterizzazione delle percentuali di dispersione nei due ambiti stratigrafico-tissutali, per poi passare ad una quantificazione mediante un indicatore definito shape-metric del pattern di dispersione. Tali momenti di analisi di immagine, caratterizzati da un crescente impiego di metodiche analitico-concettuali, hanno consentito di descrivere previo dati quantitativi il fenomeno della dispersione di un vaccino inoculato attraverso un NFID. Il presente trial ha verificato come tutti i livelli pressori adottati hanno consentito la somministrazione del vaccino in sede intramuscolare o interfasciale profonda (M), poiché non sono state rilevate differenze di massima profondità di penetrazione o pattern di dispersione valutato mediante shape metric tra i livelli pressori. Non sono note le caratteristiche costruttive del NFID impiegato, dunque non è possibile correlare le misure ottenute con parametri fisico-ingegneristici. Si sottolinea come i dati ottenuti, quantitativi continui, sono potenzialmente pronti ad essere correlati con i parametri fisico-ingegneristici del NFID (pressione, velocità del jet, viscosità del vaccino).

Si vuole ribadire come la Letteratura offre numerosi trial clinici sull'utilizzo di NFID che utilizzano il metodo della jet injection, ma sono scarsi i dati che investigano gli eventi fisico-biomeccanici di tale modalità di somministrazione di farmaci. Ovvero numerosi studi hanno voluto valutare la capacità di diverse vaccinazioni con NFID di evocare una risposta immune specifica, senza indagare le circostanze biomeccaniche ed i pattern di dispersione dei vaccini somministrati (Schramm-Baxter et al., 2004; Boom e Groenndijk, 2013). Sono presenti taluni studi che hanno utilizzato tessuti di suino per studiare il pattern di dispersione dermico di NFID (Wagner *et al.*, 2004).

L'architettura stratigrafica delle unità fasciali e muscolari e le peculiarità biomeccaniche sono fondamentali per capire le circostanze biomeccanico funzionali della dispersione del vaccino somministrato mediante jet injection.

La misura lineare della profondità, ma soprattutto la ripartizione percentuale, hanno permesso di evidenziare come soprattutto a livello di sito di inoculo si potesse evidenziare una dispersione e presenza cospicua di vaccino nello strato dermico e fasciale superficiale. Sono stati identificati e quantificati attraverso una metodica di *shape metrics* due pattern di dispersione del vaccino: uno vagamente circolare (tipicamente caratterizzante i tessuti dermo-fasciali superficiali) ed uno cosiddetto *spider web*, peculiare delle regioni interfasciali profonde ed intramuscolari. La procedura matematica elementare della linearizzazione del rapporto perimetro/area, ha consentito di trasformare in una misura quantitativa i due diversi pattern di dispersione. La forma rappresenta l'insieme delle informazioni

geometriche di un oggetto; il rapporto che è stato calcolato è un indicatore elementare di complessità della forma, ed ha consentito di ottenere dati quantitativi continui comparabili. Essa ha consentito di caratterizzare il pattern di dispersione dermico-fasciale superficiale e quello interfasciale muscolare profondo, evidenziando quantitativamente una significativa differenza. I due pattern di dispersione rispecchiano peculiarità biomeccaniche viscoelastiche dei diversi tipi di tessuti. Le sezioni S1 ed S3, a circa un centimetro di distanza dal sito di inoculo, hanno mostrato la presenza di vaccino soprattutto a livello di fascia superficiale e compartimento interfasciale profondo-intermuscolare. Adottando la modellizzazione di Schramm-Baxter e colleghi (2004), si vogliono interpretare i pattern di dispersione descritti e quantificati nel presente trial. Il modello citato prevede che in vivo siano plausibili e riscontrabili le fasi di erosione e dispersione: la fase di erosione, coerentemente con le peculiarità del derma, viene ipotizzata dagli Autori citati con la descrizione di un introductory channel non rettilineo, con componenti non solo verticali ma anche laterali di dispersione del fluido inoculato. Tale ipotesi trova riscontro nel presente lavoro, giacché le dispersioni rilevate a livello dermico sono presenti quasi sempre nella sezione che coinvolge il sito di inoculo (S2), mostrano forma vagamente circolare con rapporto linearizzato perimetro/area basso, dunque coerenti con una forma solida circolare (uno sferoide sezionato) e coinvolgono gli strati dermico-fasciali superficiali e non si può escludere che vi siano anche componenti di dispersione retrograda (backflow o splashback). La componente di dispersione dermico-fasciale superficiale della sezione S2 può essere interpretata come “introductory channel”, adottando la modellizzazione citata (2004). Più precisamente, il pattern di dispersione dermico-fasciale superficiale vagamente sferoidale rispecchia, come suggerito da Schramm-Baxter e colleghi (2004), una dispersione attraverso il derma del tipo della percolazione attraverso gli spazi liberi nel meshwork di fibre collagene ed elastiche, sostituendo la componente fluida dermica. Il tipo di dispersione che è stato descritto, verificato e quantificato nel compartimento intramuscolare interfasciale profondo è estremamente disomogeneo, la miglior descrizione qualitativa, presente in Letteratura, è spider web pattern, che può essere tradotto come pattern retiforme (Bennett et al., 1971; ElGeneidy, 1974). In questo caso non esistono in Letteratura dei modelli, ma esso viene spiegato dalla ipotetica tendenza dell'inoculo di seguire le vie di minor resistenza (Bennett et al., 1971; ElGeneidy, 1974). Sulla base dei dati in Letteratura, si può ipotizzare come, anche la dispersione nei compartimenti interfasciali profondi ed intermuscolari, al pari del derma, avvenga coerentemente con le leggi della percolazione, e la componente fasciale profonda mostra una composizione affine a quella del derma, ed è in continuità con questo. Dunque si ipotizza come il fluido che viene inoculato attraverso jet injection percola attraverso le componenti dermiche, fasciali superficiali e fasciali

profonde che costituiscono una sorta di continuum poroviscoelastico, oltre che un continuum anatomico. Le lesioni riscontrate imputabili alla somministrazione vaccinale sono state emorragie sia dermo-ipodermiche che interfasciali muscolari. Si evince come nei soggetti di minore taglia vi sia una maggiore frequenza di emorragie dermico-fasciali superficiali a livello di sito di inoculo (S2). Tale maggiore frequenza può essere putativamente spiegata con una immaturità delle fibre elastiche e collagene ed una conseguente fragilità del derma, fenomeno noto in campo dermatologico pediatrico (Chidambaramurthy, 2014). Le lesioni di tipo ascessuale o piogranulomatoso intramuscolari sono da imputarsi a pregressi trattamenti vaccinali o terapeutici a cui i suinetti sono stati sottoposti nell'azienda di provenienza, giacché trattavasi di animali convenzionali. Inoltre si sottolinea come le uniche lesioni da potersi imputare alla somministrazione tramite NFIS sono le lesioni emorragiche, poiché i soggetti sono stati sacrificati immediatamente dopo l'inoculo. La tecnica scanner-fotografica adottata ha mostrato numerosi vantaggi, tra i quali: rapidità di esecuzione, costi contenuti, ripetibilità e riproducibilità, possibilità di mantenimento delle immagini indefinitamente in formato digitale. In particolare si vuole sottolineare come la acquisizioni ortogonali di sezioni trasversali macroscopiche con un formato standard (A4) ha consentito di paragonare classi di peso estremamente diverse. Inoltre, essendo lo scanner piano uno strumento diffuso, e scanner piani diversi differiscono unicamente in termini di risoluzione, l'utilizzo di un riferimento metrico e l'effettuazione di un opportuno settaggio della scala (pixel/cm) consentono e garantiscono una accettabile riproducibilità della tecnica. Ne deriva che è possibile, con la medesima tecnica, comparare diversi NFID o strumenti di somministrazione di vaccini o farmaci. In conclusione, il presente trial ha dimostrato attraverso tecnica scanner-fotografica e metodica di analisi d'immagine che i tre livelli pressori di esercizio del NFID sono stati efficaci nella somministrazione intramuscolare del vaccino; inoltre è stato evidenziato che i soggetti di taglia inferiore (5-7 kg) mostravano lesioni emorragiche dermico-fasciali a livello di sito di inoculo, putativamente per una maggiore fragilità del derma ed azione traumatica dello stress pressorio. La tecnica utilizzata può essere proposta come metodica di confronto di diversi NFID, giacché si è mostrata ripetibile, rapida ed efficace.

Bibliografia

- Bennett CR, Mundell RD, Monheim LM (1971) Studies on tissue penetration characteristics produced by jet injection. *J Am Dent Assoc*; 83(3):625-9.
- Bianco C, Vila T. (2014) Scanography method for assessment of needle free injection dispersion pattern of vaccine in pig soft tissues. *J Vaccines Vaccin* 5: i102
- Boom B, Groendijk H (2013) Characterization of needle-free injection into soft matter and skin with continuous jets Essay- University of Twente
- Bosboom EM, Bouten CV, Oomens CW, van Straaten HW, Baaijens FP, Kuipers H (2001) Quantification and localisation of damage in rat muscles after controlled loading; a new approach to study the aetiology of pressure sores. *Medical Engineering and Physics* 23(3):195-200.
- Bremseth DL, Pass F. (2001) Delivery of insulin by jet injection: recent observations. *Diabetes Technol Ther.*; 3(2):225-32.
- Chase CCL, Scanlon Daniels C, Garcia R, Milward F, Nation T (2008) Literature -review Needle-free injection technology in swine: Progress toward vaccine efficacy and pork quality *Swine Health Prod.*;16(5):254–261.
- Chidambaramurthy S (2014) Chapter 1: Structures and function of skin in *Textbook of Pediatric Dermatology -2nd edition* Arun C. Inamadar, Aparna Palit, S. Rangunatha JP Medical Ltd, -
- Colditz IG, Paull DR (2010) Needle-free vaccination in sheep. *Aust Vet J.* 2010 Sep;88(9):368.
- Crow BA, Dikeman ME, Hollis LC, Phebus RA, Ray AN, Houser TA, Grobbel JP (2010) A comparison of needle-free and needle-injection methods and solutions for enhancement of beef longissimus lumborum muscles. *Meat Sci.*;84(3):529-37.
- Dyer RJ (2003) Needle-less Injection System for Drug Delivery Master of Science in Mechanical Engineering at the MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (MIT)
- ElGeneidy AK, Bloom AA, Skerman JH, Stallard RE (1974) Tissue reaction to jet injection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;38(4):501-11.
- Fang SH, Nishimura T, Takahashi K (1999) Relationship between development of intramuscular connective tissue and toughness of pork during growth of pigs. *J Anim Sci.*;77(1):120-30.
- Figge FHJ, Barnett DJ (1948) Anatomic evaluation of a jet injection instrument designed to minimize pain and inconvenience of parenteral therapy. *The American Practitioner* 3: 197–206.
- Geerligs M, Peters GW, Ackermans PA, Oomens CW, Baaijens FP (2008) Linear viscoelastic behavior of subcutaneous adipose tissue. *Biorheology*; 45(6):677-88.
- Gerlach BM, Houser TA, Hollis LC, Tokach MD, Nietfeld JC, Higgins JJ, Anderson GA, Goehring BL. (2012). Incidence and severity of *Arcanobacterium pyogenes* injection site abscesses with needle or needle-free injection. *Meat Sci*; 92(4):805-7
- Houser TA, Sebranek JG, Thacker BJ, Baas TJ, Nilubol D, Thacker EL, Kruse F (2004) Effectiveness of transdermal, needle-free injections for reducing pork carcass defects. *Meat Sci*;68(2):329-32.

- Marcarian HQ, Calhoun ML (1966) Microscopic anatomy of the integument of adult swine. *Am J Vet Res*; 27:765-72.
- Mitragotri S (2006) Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors. *Nat Rev Drug Discov*; 5(7): 543-8.
- Mutungu G, Ranatunga KW (1996) The viscous, viscoelastic and elastic characteristics of resting fast and slow mammalian (rat) muscle fibres. *J Physiol.*; 496 (Pt 3):827-36.
- Nishimura T (2010) The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Anim Sci J.*; 81(1):21-7.
- Ploemen IH, Hirschberg HJ, Kraan H, Zeltner A, van Kuijk S, Lankveld DP, Royals M, Kersten GF, Amorij JP (2014) Minipigs as an animal model for dermal vaccine delivery. *Comp Med.*; 64(1):50-4.
- Sasaki N (2012) Chapter 5 Viscoelastic Properties of Biological Materials in Viscoelasticity - From Theory to Biological Applications Edited by Juan de Vicente, Publisher: InTech;
- Schramm-Baxter J, Katrencik J, Mitragotri S (2004) Jet injection into polyacrylamide gels: investigation of jet injection mechanics. *J Biomech.*; 37(8):1181-8.
- Schramm-Baxter J, Mitragotri S (2004) Needle-free jet injections: dependence of jet penetration and dispersion in the skin on jet power. *J Control Release.*;97(3):527-35.
- Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ Jr, Frazier KS (2012) Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol.* ; 49(2):344-56.
- Wagner S, Dues G, Sawitzky D, Frey P, Christ B. (2004) Assessment of the biological performance of the needle-free injector INJEX using the isolated porcine forelimb. *Br J Dermatol*; 150(3):455-61.
- Willard FH, Vleeming A, Schuenke MD, Danneels L, Schleip R (2012) REVIEW: The thoracolumbar fascia: anatomy, function and clinical considerations. *J. Anat.* 221: 507–536