

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA
Dipartimento Clinico Veterinario
Sezione di Medicina Interna
Direttore: Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Dottorato di Ricerca in
Diagnostica Collaterale in Medicina Interna Veterinaria – XX ciclo
VET/08 – Clinica Medica Veterinaria

STUDIO CLINICO E GENETICO DI NUOVE MALATTIE
EREDITARIE DEL BOVINO

Tesi di Dottorato
del:
Dott. MARCO ROSSI

Coordinatore:
Chiar.mo Prof.
PAOLO FAMIGLI BERGAMINI

Relatore:
Chiar.mo Prof.
ARCANGELO GENTILE

Esame finale - Anno 2008

INDICE.

| | |
|---|------------|
| INDICE | I |
| INTRODUZIONE..... | III |
| ANOMALIE CONGENITE A CARATTERE EREDITARIO DEL BOVINO..... | III |
| 1 LA SINDROME DELL'ARACNOMELIA E ARTROGRIFOSI NEL BOVINO DI RAZZA BRUNA (SAA)..... | 1 |
| 1.1 IL FENOTIPO SAA..... | 1 |
| 1.2 REPERTI ANATOMO ED ISTOPATOLOGICI IN SOGGETTI AFFETTI DA SAA..... | 3 |
| 1.3 DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA SAA..... | 4 |
| 1.4 RIFERIMENTI A PATOLOGIE CORRELATE ALLA SAA IN MEDICINA UMANA..... | 10 |
| 1.5 DESCRIZIONE DELLA CASISTICA OSSERVATA..... | 15 |
| 1.6 QUADRO ANATOMOPATOLOGICO..... | 16 |
| 1.7 LO STUDIO DEL GENOTIPO SAA..... | 18 |
| 1.8 LO STUDIO DEL GENOMA DEI VITELLI SAA..... | 20 |
| 1.9 CONCLUSIONI..... | 25 |
| 2 LA PSEUDOMIOTONIA CONGENITA DELLA CHIANINA (PMT)..... | 27 |
| 2.1 CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA DELLA CONTRAZIONE MUSCOLARE SCHELETRICA..... | 30 |
| 2.2 CASISTICA OSSERVATA PRESSO IL DIPARTIMENTO CLINICO VETERINARIO DI BOLOGNA..... | 34 |
| 2.3 QUADRO CLINICO DELLA PMT..... | 36 |
| 2.4 QUADRO EMATOBIOCHIMICO..... | 38 |
| 2.5 QUADRO ELETTROMIOGRAFICO..... | 40 |
| 2.6 QUADRO ISTOLOGICO, IMMUNOISTOCHEMICO E BIOCHIMICO DEL MUSCOLO PMT. 41 | |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.7 | DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA PMT. | 43 |
| 2.8 | UN MODELLO ANIMALE PER LA MEDICINA UMANA: PMT E MALATTIA DI BRODY. 48 | |
| 2.9 | LO STUDIO DEL GENOTIPO. | 52 |
| 2.10 | CONCLUSIONI | 55 |
| 3 | L’ASCITE CONGENITA DEL VITELLO ROMAGNOLO (PCS). | 57 |
| 3.1 | CARATTERISTICHE ANATOMOPATOLOGICHE DELLA PCS. | 58 |
| 3.2 | QUADRO ISTOLOGICO. | 61 |
| 3.3 | DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA PCS. | 62 |
| 3.4 | PATOLOGIE CORRELATE ALLA PCS IN MEDICINA UMANA. | 66 |
| 3.5 | LO STUDIO DEL GENOTIPO DEI VITELLI “PANCIONI”. | 70 |
| 3.6 | CONCLUSIONI | 75 |
| 4 | DISCUSSIONE. | 77 |
| 4.1 | RINGRAZIAMENTI. | 78 |
| 5 | BIBLIOGRAFIA | 80 |

INTRODUZIONE.

Anomalie congenite a carattere ereditario del bovino.

Anormalità strutturali o funzionali di cellule, tessuti o organi presenti alla nascita sono chiamate anomalie congenite. Questi difetti di sviluppo possono essere causati da fattori ambientali, genetici o cromosomiali. Anomalie funzionali e strutturali possono associarsi dando origine alle sindromi. I difetti congeniti e le malattie genetiche sono principalmente identificate tra quelle responsabili di mortalità embrionale, morte fetale, mummificazione, aborto, dismaturità, nascita prematura e nati mortalità. Nella pratica clinica si riscontrano numerose anomalie funzionali ed anatomiche la cui patogenesi ha origine durante lo sviluppo. Talvolta queste condizioni non sono evidenti alla nascita ma lo diventano più tardi quando l'animale incomincia a camminare oppure al raggiungimento della maturità sessuale, quando è quindi più attivo.

I difetti congeniti nei bovini sono relativamente infrequenti se pensiamo che in totale coinvolgono probabilmente circa 1 caso su 500 vitelli nati e forse più di 1 su 100 vitelli se si campiona un numero maggiore di allevamenti. In uno studio limitato ai soggetti afferiti presso cliniche veterinarie americane e canadesi, 6455 su 137.717 vitelli mostravano difetti congeniti. Un altro studio eseguito in Germania su 2293 vitelli nati nell'arco di 9 anni, ha calcolato una percentuale di anomalie congenite a carico del SNC pari al 21,6% e del 13,7% a carico dell'apparato muscolo scheletrico. Nello stesso studio il 10% era rappresentato da gemelli anomali, il 9,7% da disturbi congeniti sistemici (idrope), il 6,9% erano invece le anomalie a carico delle grandi cavità corporee (schistosoma reflexus) , il 4,3% riguardavano l'apparato digerente mentre i difetti a

carico delle ossa e delle cartilagini erano il 2,8%. Una percentuale del 2,7% invece coinvolgeva l'apparato cardiovascolare.

Un accurato esame anatomopatologico eseguito su 107 vitelli clinicamente normali, ha rivelato che i difetti anatomici minori sono molto frequenti. Queste anomalie sono chiaramente descritte solo in seguito ad autopsie molto accurate quindi la frequenza di difetti congeniti dipende non solo dalla loro specifica frequenza con cui accadono, ma anche dalla accuratezza dell'esame anatomopatologico (Saperstein G., 2002).

I difetti congeniti variano da deviazioni semplici o anomalie di grado moderato fino a forme gravi e mostruose. Essi sono la sentinella dell'ambiente in cui vivono gli animali e rappresentano una sfida diagnostica di alto valore medico. Infatti un soggetto malato è un sopravvissuto ad un evento o eventi patologici deleteri causati dal proprio patrimonio genetico o da quello dei genitori o dall'ambiente in cui vivono o sono vissuti o addirittura è il frutto dall'interazione della genetica con l'ambiente. Gli eventi distruttivi che portano alle anomalie congenite avvengono durante uno o più stadi dell'intera sequenza che costituisce l'embriogenesi e lo sviluppo prenatale. Lo sviluppo embrionale è il risultato di interazioni tra il genoma e fattori epigenetici che provocano differenze individuali nelle vie metaboliche e in numerose caratteristiche strutturali quantitative. L'epigenesi comprende tutte le modificazioni provocate in una cellula embrionale dalle interazioni con cellule o molecole circostanti. A causa della complessità dei processi di sviluppo, numerose fasi dell'embriogenesi richiedono l'intervento sequenziale di più geni. Processi quali la morfogenesi degli arti e della faccia, lo sviluppo dell'encefalo e del midollo spinale sono sotto il controllo poligenico. Il carattere legato al colore è invece sotto controllo monogenico. Se un determinato evento deleterio per l'individuo non risulta immediatamente letale, è seguito dalla fisiologica sequenza di sviluppo, la quale deve correggere l'evento stesso e le sue sequele. Spesso questo non è possibile e l'embrione o il feto muore

prima del completo sviluppo e viene riassorbito o espulso. Altre volte nascono animali deformati e mostruosi. Altre volte ancora, un determinato evento patologico genetico può non essere letale e ma causare lo sviluppo di individui vitali ma con fenotipo incompatibile con le esigenze allevatoriali.

Molti difetti e patologie congenite non hanno una causa ben definita e i fattori responsabili sono svariati. I fattori ambientali sono rappresentati da piante tossiche, da virus, protozoi e da deficienze alimentari. I fattori fisici come manipolazioni esterne precoci sulla parete dell'utero o l'esposizione a radiazioni possono danneggiare lo sviluppo embrionale. Geni mutati e anomalie cromosomiche rappresentano i fattori genetici che agiscono alterando il processo di sviluppo dell'embrione. Dal momento che la rarità con cui queste patologie si manifestano è notevole, è spesso difficile

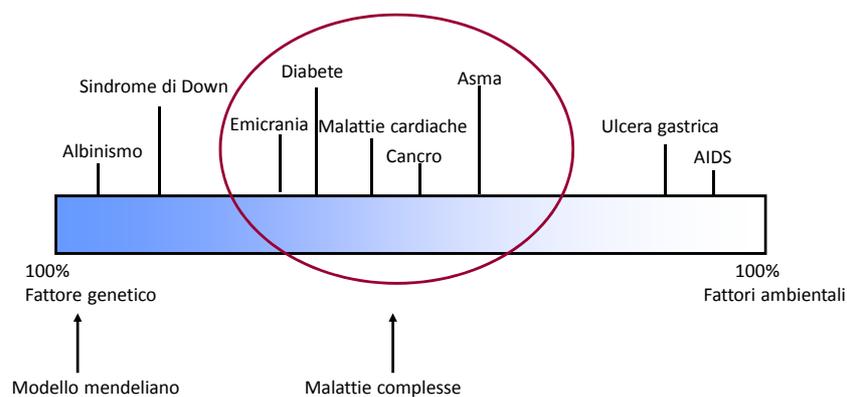


Figura 1: rapporto tra ambiente e fattori genetici nella patogenesi delle malattie.

stabilirne l'eziologia e questo potrebbe richiedere il reperimento di molti casi nel corso di diversi anni. Tuttavia una determinata patologia ereditaria

può manifestarsi in un allevamento o in più allevamenti nell'arco di pochi anni, rendendo più semplice la diagnosi eziologica. Spesso la stessa tara genetica continua a manifestarsi nella stessa razza di origine e questo usualmente consente di concludere che sia dovuta alla stessa mutazione salvo evidenti cambiamenti morfologici. Tuttavia quando la malattia compare in un'altra razza nella quale non è mai stata descritta prima, bisogna valutare con attenzione l'ipotesi che la mutazione sia identica a quella iniziale a meno che la nuova razza colpita non sia un ramo della prima.

Per determinare la causa di un difetto ereditario, è fondamentale uno

| Caratteristiche | Eziologia genetica | Eziologia ambientale |
|--|--|---|
| Fenotipo | Espressione fenotipica ben caratterizzata e relativamente costante | Usualmente variabile; difetti di sviluppo legati all'età di gestazione dell'embrione o del feto al momento dell'esposizione |
| Pattern di distribuzione nella popolazione | Avviene più frequentemente in una popolazione o razza ben definita | I difetti non sono legati alla razza dei malati |
| N° degli animali affetti | Usualmente sporadico nell'arco di molto tempo | Potrebbe colpire molto animali in un allevamento |
| Distribuzione geografica | Distribuzione spesso confinata ad una particolare razza in un'area ben definita | La malattia può essere confinata ad una specie animale particolare, è indipendente dalla razza e potrebbe colpire un discreto n° di animali suscettibili |
| Patogenesi | Il difetto di solito è specifico per un tessuto specifico, un apparato o una proteina | I tessuti bersaglio cambiano o i difetti colpiscono più di un apparato |
| Ruolo dei fattori ambientali nella patogenesi | Di solito indipendente da fattori ambientali, tuttavia le manifestazioni cliniche di una condizione possono essere indotte da influenze ambientali | Tipicamente sono associati all'esposizione di fattori ambientali o fattori fisici di danneggiamento, consumo di piante tossiche, trattamento con farmaci o infezioni. |

Tabella 1: Caratteristiche delle malattie congenite che possono essere usate per determinare se sono di origine genetica o ambientale.

scrupoloso studio della casistica che si basa su un'accurata descrizione della malattia, su una valutazione sistematica del management e delle condizioni ambientali dell'allevamento e sul reperimento di materiale genetico.

Particolare attenzione deve essere posta alla razza, pedigree e data di nascita dei soggetti. Se nel caso delle malattie ereditarie a modello mendeliano l'influenza ambientale è trascurabile, nel caso delle tare congenite a carattere ereditario a modello complesso, l'influenza di fattori non genetici può essere fondamentale nel determinare l'incidenza della malattia. Le mutazioni possono essere definite come cambiamenti casuali permanenti nella sequenza nucleotidica di un gene; avvengono spontaneamente o possono essere indotte da influenze esterne. Questi cambiamenti avvengono in seguito a sostituzione, inserzione o delezione di basi nucleotidiche. L'impatto di una mutazione sullo sviluppo animale dipende dal tipo di alterazione della conformazione o della funzione del prodotto finale del gene.

Mutazioni che non coinvolgono una regione codificante o che non alterano la sequenza aminoacidica di una proteina, sono chiamate mutazioni silenti. Altre mutazioni, invece, possono compromettere completamente la funzione di una proteina o ridurne l'attività; le mutazioni in geni che sono essenziali per la sopravvivenza sono descritte come letali.

I modelli di ereditarietà di un singolo gene possono essere semplificati secondo i principi della genetica mendeliana come dominanti, recessivi, co-dominanti o parzialmente dominanti. Un allele è recessivo quando l'effetto fenotipico non è espresso nell'animale eterozigote, mentre gli alleli dominanti sono fenotipicamente espressi negli animali eterozigoti.

Grazie allo sviluppo della ricerca nel campo della genetica molecolare e della biochimica, l'eziologia di molte patologie congenite è stata identificata. I test di laboratorio per la diagnosi di malattie genetiche

includono il cariotipo, l'analisi del pedigree e la genotipizzazione. Il cariotipo può essere utilizzato per individuare aberrazioni cromosomiche evidenti mentre l'analisi del pedigree fornisce informazioni relative alla storia genetica di una determinata popolazione o razza. Il genotipo invece, può essere utile nell'identificare alleli o markers associati ad una particolare sequenza genetica, identifica il "polimorfismo" di un determinato tratto genomico, cioè la presenza nella popolazione di 2 o più varianti (markers, alleli) con frequenze significative. In particolare, il genotipo di soggetti malati e quello dei progenitori raccolti all'interno di famiglie, è fondamentale per stabilire la concatenazione dei loci (*analisi di linkage*) o co-segregazione degli alleli.

Con analisi di linkage, s'intende l'identificazione di un aplotipo che accomuna i soggetti sani portatori a quelli malati; l'aplotipo inquadra una specifica sequenza allelica che si tramanda tal quale alla discendenza e che individua segmenti di cromosomi che possono essere tracciati nella popolazione (Nicholas S.W., 2003). Un soggetto portatore sano tramanda alla discendenza un determinato aplotipo che potrà manifestarsi come malattia o come non malattia in relazione al modello mendeliano con cui la mutazione tende ad ereditarsi. Se la malattia è autosomica recessiva a penetranza completa, i cromosomi sessuali verranno esclusi dallo studio e i portatori sani saranno accumulati dallo stesso aplotipo ma con genotipo eterozigote per l'aplotipo associato a malattia. Viceversa, un soggetto malato avrà lo stesso aplotipo di un altro soggetto affetto dalla stessa patologia (identica base patogenetica di malattia) e sarà omozigote per quella sequenza allelica associata a malattia. Il linkage è presente quando gli alleli di un marker tendono a co-segregare con la malattia all'interno di una o differenti famiglie, sono cioè concatenati alla malattia (*linked*). Il linkage se presente, deve permettere di seguire la parentela per più marcatori, quindi differenti alleli markers possono essere associati con il tratto bersaglio in famiglie diverse.

Possiamo concludere che l'analisi di linkage è la procedura per mappare o trovare la posizione di un gene o più geni responsabili di un determinato fenotipo sui cromosomi (*genome linkage scan*).

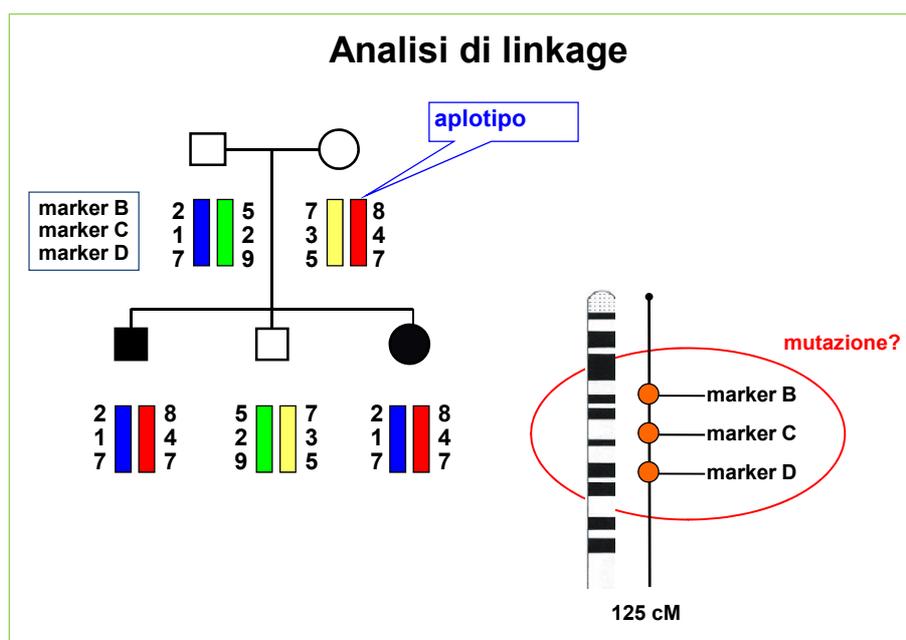


Figura 2: esempio di analisi di linkage con identificazione dell'aplotipo in rosso: alleli che si tramandano in blocco da una generazione all'altra. Se fosse una tara ereditaria a carattere autosomico dominante a penetranza completa, si avrebbe che i tre soggetti con aplotipo in rosso manifesterebbero la malattia.

Alla base dell'identificazione di un linkage tra un marker e un fenotipo, si devono considerare i modelli statistici utilizzati come strumenti di controllo per valutare se l'associazione osservata è reale e non è condizionata dal caso. Per svolgere questo controllo la statistica si avvale in primo luogo della "frazione di ricombinazione" (θ), funzione che stima la distanza di due loci (*marker*); più due loci sono distanti più è probabile che eventi di crossing over li separino (*ricombinazione*). Se la θ ha un valore pari a 0,5 i loci sono assortiti in modo indipendente, viceversa se la θ ha un valore inferiore a 0,5 i loci saranno associati tra loro. La funzione che viene

esprime la misura statistica del linkage è il \log_{10} di θ , il *LOD score* (Z) (Morton N.E., 1955). In particolare Z calcola il rapporto tra la probabilità che i loci siano associati per una determinata θ_x e la probabilità che non lo siano $\theta_{0,5}$. Un valore di Z pari o maggiore di 3 indica che due loci sono linked, per un dato pedigree la probabilità che i due loci non siano linked è inferiore a 1 su 1000 ($p = 0,001$), mentre se Z è pari a -2, i due markers non sono associati ma presentano un assortimento indipendente. Il Log score può essere calcolato semplicemente tra due loci oppure tra più markers e un gene mutato.

I software che eseguono analisi di linkage mediante il calcolo del Log score disponibili online sono diversi: Merlin, CriMap, FastLink e GeneHunter per citarne alcuni, altrimenti rimandiamo al sito: www.linkage.rockefeller.edu/soft/.

Il metodo statistico scelto per lo studio di un linkage è in relazione al tipo di famiglia che si ha a disposizione. Se la famiglia è piuttosto grande e ha un chiaro pattern di ereditarietà, è generalmente meglio applicare l'analisi di linkage per dati parametrici. Questo approccio definisce un'esplicita relazione tra il fenotipo e l'aplotipo ma richiede un modello di ereditarietà mendeliana da applicare alla malattia con stima della frequenza allelica (quanto spesso l'allele mutato co-segrega con la malattia e viceversa) e definizione della penetranza. Il modello di ereditarietà verrà così sfruttato per desumere la segregazione degli alleli mutati attraverso il pedigree.

Se invece il numero di famiglie estese è esiguo ed il pattern di ereditarietà non può essere determinato, è meglio in genere utilizzare il modello non parametrico. Questo metodo generalmente consiste nell'osservare se soggetti affetti tendono ad ereditare, all'interno di un pedigree, gli stessi alleli per un determinato marker. E' quindi, un'analisi che evidenzia la condivisione di segmenti cromosomici (loci) tra gli individui di una famiglia. Concetto chiave del modello non parametrico è l'analisi IBD (*identical by*

descend), attraverso la quale si identifica il tratto di genoma comune per discendenza, quindi un segmento cromosomico del padre che è presente in tutti i figli malati e ma non nei figli sani. Se il patrimonio genetico della discendenza proviene per il 50% dal padre e per il rimanente 50% dalla madre, l'IBD sarà del 50%. Quando all'interno di una famiglia, compaiono figli malati accumulati da particolari alleli con IBD a frequenza maggiore del 50%, si desume che questi alleli siano ritenuti concatenati con il gene mutato.

Un modello statistico che si differenzia dall'analisi di linkage è quello dell'analisi di associazione genica. Viene applicato quando i soggetti in studio non sono raggruppabili in famiglie ma piuttosto sono singoli individui non correlati tra loro. Lo studio di associazione si basa sulla comparazione tra un gruppo di malati con una popolazione di controllo, mirando ad individuare specifici alleli markers che sono iperespressi tra i malati e sono correlati con un tratto genomico all'interno della popolazione. Se l'analisi di linkage studia la concatenazione di alleli associati ad un fenotipo all'interno di un pedigree, l'analisi di associazione mira ad individuare la relazione tra allele marcatore e allele malattia all'interno di una popolazione, fatto che presuppone un'estrema vicinanza tra marker e locus bersaglio. La risoluzione della mappatura genetica fornita dall'analisi di associazione, è maggiore in presenza di un elevato numero di individui non correlati tra loro. Lo strumento che permette di individuare un'associazione tra alleli è il "*linkage disequilibrium*" (LD), che definisce la presenza di associazione statistica tra specifici alleli relativi a due o più loci strettamente associati. Questa combinazione di markers costituisce un particolare aplotipo ancestrale, diffuso nella popolazione in cui è rilevato, perché trasmesso lungo la discendenza da un comune antecore (*founder*). Ne deriva che, mediante l'LD è possibile individuare regioni cromosomiche di limitata ampiezza in cui si collocano i geni responsabili di una determinata malattia. E' prevedibile infatti che, se i loci

sono strettamente concatenati con la mutazione e gli eventi di ricombinazione tra i due loci sono rari, i soggetti che hanno ereditato lo stesso aplotipo, abbiano ereditato anche la mutazione in esso contenuta. L'LD risulta essere un valido strumento se applicato a popolazioni omogenee.

Al di là del grande interesse legato alla storia della medicina fornito dai vitelli mostri considerati come "scherzi della natura", i difetti e le anomalie congenite sono responsabili di perdite inferiori rispetto a quelle causate da deficienze nutrizionali, da agenti infettivi o neoplasie. Tuttavia, un'anomalia ereditaria potrebbe essere motivo di perdite economiche considerevoli da parte dei singoli allevatori a causa dell'aumento della mortalità perinatale o quando la mortalità fetale o embrionale fanno parte di una sindrome. I difetti e i disordini congeniti potrebbero inoltre, confondere la diagnosi di altre malattie e aborti. Un altro aspetto riguarda direttamente i produttori di bovini di razza che potrebbero vedere ridurre drasticamente il valore di propri animali nel momento in cui venisse diagnosticata una tara genetica di quella determinata razza. Per questo motivo, sono necessari estesi interventi sanitari mirati a regolare e controllare i programmi di selezione di razza ed è opportuno ottenere una stima anche grossolana per capire la natura e l'incidenza di una determinata anomalia genetica per poi affrontarla (McGeedy T.A., 2006). Compito del veterinario non è solo quello di identificare la diagnosi di queste anomalie ma anche di sensibilizzare gli allevatori a denunciare queste problematiche, di valutare le possibili cause, di stimare l'eventuale rischio di ereditarietà e individuare i possibili agenti teratogeni presenti nell'ambiente (Andrews A.H, 2004).

1 LA SINDROME DELL'ARACNOMELIA E ARTROGRIFOSI NEL BOVINO DI RAZZA BRUNA (SAA).

Tra le malattie ereditarie che affliggono i bovini di razza Bruna, oltre alla conosciuta "sindrome di Weaver", vengono incluse l' "Atrofia muscolo-spinale" (SMA), la "Dismielogenesi Spinale" e l' "Aracnomelia".

Queste patologie trovano scarsa documentazione nella letteratura internazionale e quasi completa assenza in quella nazionale come nel caso dell'Aracnomelia pur essendo già stata descritta (Testoni S., 2004;).

La sindrome dell'Aracnomelia e dell'Artrogrifosi (SAA) è una condrodisplasia descritta per la prima volta in Germania nel 1975 (Rieck G.W., 1975); successivamente altre segnalazioni sono comparse in Austria, Svizzera e Stati Uniti (Leipold H.W., 1989). Le segnalazioni riguardavano vitelli di razza Brown Swiss per i quali è stato identificato uno stesso progenitore, il toro americano "Norvic Lilasons Beautician". Oltre che nella razza Bruno-alpina svizzera e nei relativi incroci, la malattia è stata osservata nella razza Pezzata rossa, Pezzata nera, Limousine (Brem G., 1984; König H., 1987; Leipold H.W., 1989) e Bruna italiana (Testoni S., 2004).

La SAA è conosciuta anche come "Spider legs" o "Spider limbs" per la somiglianza dei soggetti affetti con il ragno.

1.1 Il fenotipo SAA.

I vitelli aracnomelici vengono partoriti di solito morti e sono caratterizzati da arti eccezionalmente lunghi, scarsamente muscolosi e sottili che

conferiscono al vitello un aspetto da ragno, è costante l'atteggiamento di cifoscoliosi. Le articolazioni sono abnormemente mobili oppure irrigidite, spesso incurvate con vari gradi di torsione e arrovesciamento. Le ossa lunghe risultano particolarmente fragili (Marcato P.S., 2000).

E' una malattia congenita a carattere ereditario probabilmente monogenica con trasmissione di tipo autosomico recessivo. Secondo alcuni



Figura 3: classico aspetto fenotipico di un vitello SAA di razza Bruna. (per gentile concessione del Dott. Drogemüller, Berna)

autori il difetto sembra colpire il tessuto connettivo con conseguente anomalo sviluppo scheletrico (RieckG.W., 1975), altri invece ritengono coinvolto il tessuto neuromuscolare con lesioni ossee secondarie (König H., 1987).

La mutazione genica monozigote è sempre letale; se i vitelli nascono vivi, vanno incontro a morte spontanea dopo poche ore.

1.2 Reperti anatomo ed istopatologici in soggetti affetti da SAA.

Le principali lesioni evidenziate al tavolo anatomopatologico sono rappresentate da deformità facciali quali: cranio corto e raccolto con un solco nell'osso frontale e brachignazia (la lunghezza della mandibola è circa 5 – 10 cm). La concavità della faccia dorsale della mascella risulta in un tipico profilo camuso della testa, simile a quello del cane di razza Pointer. Nella scatola cranica la falce e il tinterio membranaceo sono sottosviluppati e gli emisferi cerebrali sono fusi tra loro tramite una pseudocisterna. Le anomalie oculari sono rappresentate dalla lussazione del cristallino e cataratta.



Figura 4: Particolare della testa di un vitello di razza Bruna affetto da SAA, caratteristico è il muso camuso e la brachignazia.

E' occasionale reperire malformazioni cardiache dovute alla completa trasposizione del tronco arterioso, all'ipertrofia concentrica di entrambi i ventricoli e alla persistenza del foro di Botallo e del Forame ovale. Si riscontrano anche aneurismi della radice dell'aorta e dell'arteria polmonare più o meno conclamati, più rara è la rottura dell'aorta e il

tamponamento cardiaco. Caratteristico è invece, l'incurvamento della colonna vertebrale che obbliga il vitello in atteggiamento di cifosi tanto da disegnare un'accentuata gobba. Le epifisi delle ossa lunghe non sembrano così sottili come invece si mostrano le diafisi soprattutto del metacarpo e metatarso. La sottigliezza della struttura ossea è dimostrata spesso anche dalle numerose fratture che colpiscono gli arti. La fragilità ossea sembra dovuta non ad alterazioni strutturali della corticale, come ad esempio nell'osteoporosi e nell'osteogenesi imperfetta, ma ad una riduzione in diametro della diafisi a spese della cavità midollare, con riduzione di quest'ultima fino alle dimensioni di uno spillo. Una grave atrofia dei muscoli degli arti che appaiono pallidi, giustifica ulteriormente la denominazione di "Spider legs" (Leipold H.W., 1993; Dirksen G., 2002).

Gli arti abnormemente incurvati, appaiono più lunghi e sottili del normale (dolicoftenomelia), mentre le porzioni distali degli arti posteriori sono affette da gravi anomalie angolari. In particolare, ad una marcata iperestensione dei nodelli sono da aggiungere dita rivolte cranialmente e parallelamente al corpo del soggetto. Le articolazioni del carpo, tarso e nodello sono bloccate o manifestano vari gradi di fissità (*artrogriposi*) (Dirksen G., 2002). E' da sottolineare l'importanza dell'esame anatomopatologico in quanto possono riscontrarsi fenocopie.

1.3 Diagnosi differenziale della SAA.

I difetti del sistema muscolo scheletrico sono la maggior parte delle più comuni anomalie congenite negli animali da reddito. Nel Bovino, sono stati descritti fino a 476 difetti di ossa, articolazioni e muscoli. Molti sono letali, altri sono incompatibili con la vita in quanto interferiscono con la pressione dell'alimento. Alcune anomalie occorrono spesso in combinazione con altri, infatti la maggior parte dei difetti dell'asse scheletrico si manifesta in vitelli

con palatoschisi e artrogrifosi. La diagnosi differenziale della SAA si limita a quelle patologie congenite caratterizzate da malformazioni dell'apparato muscolo scheletrico. I bovini spesso risultano affetti da forme congenite di incurvamento ed irrigidimento degli arti nonché anomalie della colonna vertebrale.

Sono descritti rari episodi di distocia dovuta ad *"anchilosi multipla congenita"* nei vitelli di razza Holstein caratterizzata da fusione delle superfici articolari dei corpi vertebrali e degli arti con conseguente rigidità muscolo scheletrica di vario grado. Prolungate disuguaglianze nella tensione muscolare o immobilità intrauterina provocano modificazioni delle capsule articolari, dei legamenti e delle superfici articolari che determinano il blocco permanente dell'articolazione. I feti colpiti hanno un collo molto corto e si associa a cifosi (Dirksen G., 2002).



Figura 5: Vitello affetto da *"Short Spine Lethal"* o c.d. *"vitello alce"*. Evidente la sproporzione tra testa-collo e tra arti-tronco.

Anomalie più gravi a carico della colonna vertebrale, sono responsabili di vitelli con aspetto esteriore vicino alla mostruosità, ne è un esempio il cosiddetto *"vitello alce"*. E' conosciuto anche come *"Short spine lethal"*, la cui base patogenetica è un difetto autosomico recessivo semplice. Il

fenotipo è caratterizzato da brachignazia, dall'assenza di vertebre cervicali, toraciche e delle relative coste, associato alla particolare lunghezza delle apofisi spinose delle vertebre toraciche. L'aspetto macroscopico è dominato dalla sproporzione tra il tronco, abnormemente tozzo con gli arti molto lunghi. I soggetti affetti nascono morti o muoiono nel primo giorno di vita (Dirksen G., 2002; Testoni S., 2005).

Il "*Perosomus elumbis*" risulta invece accorciato per la mancanza delle vertebre lombari, sacrali e coccigee e pertanto la parte anteriore del corpo risulta sovrasviluppata. Costante è l'artrogriposi e l'anchilosi delle articolazioni degli arti posteriori. Si sospetta l'ereditarietà della patologia (Testoni S., 2005).

La prematura chiusura delle cartilagini di coniugazione delle vertebre toraciche e lombari nei vitelli neonati, "*Congenital spinal stenosis*", determina il restringimento del canale vertebrale, protrusione dei processi articolari vertebrali, ossa lunghe accorciate e malformate. I soggetti affetti presentano vari gradi di atassia e paralisi del treno posteriore (Dirksen G., 2002)

Una malformazione più frequente è la "*Spina bifida*" causata dalla mancata chiusura del tubo neurale o incompleta chiusura della lamina dorsale che forma l'arco vertebrale. La lesione si localizza prevalentemente a livello delle vertebre toraciche e lombari. Si associa ad artrogriposi degli arti posteriori. Sembra una malattia autosomica recessiva (Dirksen G., 2002).

In Danimarca è stata recentemente descritta una malformazione vertebrale complessa (CVM) caratterizzata dalla deformazione, accorciamento e fusione dei corpi vertebrali e delle relative coste responsabili di un marcato incurvamento cervico-toracico. E' presente anche artrogriposi bilaterale simmetrica agli arti anteriori e posteriori. Frequenti sono la macroglossia e difetti cardiaci quali comunicazione interventricolare e persistenza del

dotto arterioso. La malformazione è ereditaria su base autosomica recessiva, dovuta ad una mutazione del gene SLC35A3 (sostituzione G>T 559) mappato sul BTA 3 e responsabile della sintesi di una proteina con



Figura 6: vitello affetto da CVM, evidenti il collo corto, la macroglossia, l'artrogrifosi e l'accorciamento del tronco.

funzione di trasporto dell'N acetilglucosamina. (Thomsen B., 2006).

Casi di CVM sono stati descritti anche in Italia (Gentile A., 2004).

Besser e Coll hanno descritto una sindrome congenita in vitelli Limousine che presentava anomalie simili a quelle descritte nella sindrome di Marfan dell'uomo tanto da chiamarla "*Sindrome bovina di Marfan*". In particolare, i vitelli colpiti erano cifotici, mostravano arti lunghi e sottili, grave lassità tendinea e articolare, cristallino piccolo e sferico, ectopia lentis dorsale o dorso-mediale, cataratta di grado grave o moderato, iperreflettività retinica. Alterazioni cardiache erano rappresentate da un soffio cardiaco sistolico auscultabile con maggior intensità a livello della base sinistra e dilatazione aortica. I vitelli affetti nascono vivi ma vanno frequentemente

incontro a morte spontanea nei primi anni di vita per turbe a carico dell'apparato cardiovascolare come rottura dell'aorta e dell'arteria polmonare (Besser T.E., 1990; Potter K.A., 1994). Le lesioni ultrastrutturali a carico delle pareti dei vasi arteriosi di maggior calibro sono caratterizzate da fibre elastiche sottili e scure, con abbondanti ammassi di microfibrille aggrovigliate alla periferia. Grovigli di fibre collagene e fasci di cellule muscolari lisce ipertrofiche rimpiazzano le lamine elastiche danneggiate. Queste stesse alterazioni strutturali sono sovrapponibili a quelle identificate in umana (Potter K.A., 1994). Esami biochimici eseguiti sulla elastina estratta dalle pareti dei vasi arteriosi principali hanno dimostrato la presenza di una normale concentrazione di elastina a fronte di un eccesso di collagene (Parsons J.C., 1992). Ulteriori studi hanno dimostrato come fibroblasti in coltura prelevati da cellule della muscolatura liscia dell'aorta e da cellule del corpo ciliare di vitelli malati, hanno mostrato un'alterazione dell'aggregazione microfibrillare nonché una concentrazione inferiore di fibrillina della matrice extracellulare (Pessier A.P., 1996). Nel 2005 uno studio ha definitivamente validato l'ipotesi che la "*sindrome bovina di Marfan*" potesse essere considerata e usata come modello animale dell'omonima sindrome umana. Venne infatti identificata una mutazione a livello dell'esone 29 mappato sul cromosoma 10 che codifica per il 15° dominio del fattore di crescita epidermico simile legante il calcio (cbEGF-like) della fibrillina1 (41 aminoacidi) coinvolto nella formazione della struttura rigida della fibrillina1. La fibrillina1 è la maggior componente della matrice extracellulare. Questa mutazione si esplica con la sostituzione del 4° residuo (*acido glutamico*) della sequenza consenso con una lisina in posizione 1200. La capacità di legare il calcio da parte della fibrillina1 è essenziale anche per sua resistenza alla proteolisi (Reinhardt, 1997; Singleton A.C., 2005).

L'*artrogriposi* è uno dei più frequenti disordini congeniti dei vitelli caratterizzato da deformità degli arti dovuta a contrattura o blocco articolare, fissazione dell'articolazione, spesso accompagnate da atteggiamenti viziosi in flessione o iperestensione con conseguente impossibilità a mantenere la stazione quadrupedale. Le cause che inducono artrogriposi in patologia veterinaria sono variabili, a volte il problema primario è nel muscolo ma nella maggior parte dei casi il problema è a carico del sistema nervoso. A differenza delle deviazioni e delle contratture, si ritiene che la causa primaria sia neurogena o dovuta a fenomeni displasici dei muscoli su base congenita. In particolare un'atrofia o displasia muscolare provoca anomale tensioni sull'articolazione causandone la deformità.

Differentemente una lesione congenita del sistema del moto neurone inferiore o dei nervi periferici può risultare in una grave alterazione dello sviluppo delle miofibrille con conseguente atrofia e contrattura del muscolo. Le alterazioni osteoarticolari (ispessimento e retrazione capsulare e legamentosa, anomalo sviluppo delle superfici articolari) si instaurerebbero secondariamente, determinando la fissità dell'articolazione (Borghetti P., 2002). L'artrogriposi, più raramente, può dipendere anche da una malformazione articolare congenita che risulta in incongruità delle superfici articolari conseguente ad una grossolana deformità delle ossa (Wooddard J.C., 1997; McGavin M.D., 2001; Stover S.M., 2002; Weaver A.D., 2004; Weisbrode D.E., 2007).

Nella maggior parte dei casi è di origine genetica ma è stata associata anche a fattori ambientali; tuttavia essendo una patologia multifattoriale, è spesso accompagnata da altri difetti come scoliosi (*Crooked calf disease*), torcicollo, meningocele, ipoplasia cerebellare, colobomi oculari e palatoschisi. Dal punto di vista eziologico oltre alla causa genetica, è legata

ad inattività o paralisi del feto in utero , ipoplasia tendinea, ingestione da parte della madre di piante tossiche o carenze alimentari e infezioni virali in utero (Radostits O.M., 2007).

Nei vitelli di razza Charolais è descritta una rigidità articolare congenita associata a palatoschisi (*HCAR*), patologia ereditaria recessiva monogenica con bassa penetranza nei soggetti di razza pura francesi. Differentemente, si manifesta con alta penetranza nei soggetti meticci (7/8 Charolais) canadesi dove la frequenza della mutazione nei bovini di razza pura Charolais e nei meticci è alta. Nei soggetti meticci la condizione di omozigosi della malattia è, nella maggior parte dei casi, letale mentre in un numero consistente di soggetti di razza pura Charolais si evidenziano anomalie più leggere e compatibili con la vita. Nella forma più grave tutti gli arti sono colpiti anche se la prevalenza è maggiore in quelli anteriori. Le articolazioni distali sono più rigide e bloccate rispetto a quelle prossimali. Evidente è l'atrofia e il pallore muscolare, mentre nel 40% dei casi si osserva palatoschisi (Dirksen G., 2002; Saperstein G., 2002; Radostits O.M., 2007).

Nella Frisona è conosciuta anche una forma di "*artrogriposi ereditaria*" associata a displasia dentale, nella quale le anomalie più evidenti sono solo un eccesso di cartilagine epifisaria, una flessibilità eccessiva delle articolazioni e denti troppo mobili e morbidi (Dirksen G., 2002; Radostits O.M., 2007).

1.4 Riferimenti a patologie correlate alla SAA in medicina umana.

Alcuni autori hanno trovato correlazione tra la SAA e la "*sindrome di Marfan*" dell'uomo (Rieck G.W., 1975; Besser T.E., 1990).

Questa sindrome, descritta nel 1896 da Marfan, è attualmente classificata tra le malattie dei tessuti connettivi. Si tratta di una sindrome rara, congenita familiare che associa anomalie morfologiche, oculari e cardiovascolari. Molto variabile è la combinazione dei segni della malattia così come la gravità. Circa il 75-80% dei casi è familiare e si trasmette mediante ereditarietà autosomica dominante. I rimanenti casi sono il frutto di episodi sporadici dovuto a nuove mutazioni. L'incidenza è valutabile in 1 malato su 5.000 nati. La sindrome di Marfan è il risultato di un difetto ereditario di una glicoproteina chiamata Fibrillina -1 che rappresenta la principale componente delle micro fibrille presente nella matrice extracellulare. Questa glicoproteina è codificata dal gene FBN1 locato sul cromosoma 15; le mutazioni a carico del FBN1 sono oltre 500. Le anomalie morfologiche del sistema scheletrico sono le più evidenti, trattandosi di individui precocemente più alti della norma, talora ai limiti del gigantismo, gracili e con arti lunghi ed esili, sproporzionati rispetto al tronco: l'apertura delle braccia è maggiore della statura. Le estremità presentano dita eccessivamente allungate e sottili, talvolta contratte (*arti da ragno*), l'alluce è eccessivamente lungo.

Generalmente si ha cranio lungo e viso stretto, talvolta si notano prognatismo, palatoschisi e dismorfismi dei padiglioni auricolari. La colonna vertebrale assume progressivamente atteggiamenti viziati: cifoscoliosi (spesso evidente prima dei 6 anni e rapidamente evolutiva),. L'eccessiva lassità legamentosa consente un'anomala motilità articolare. Nei casi meno frequenti le articolazioni del ginocchio e gomito vengono interessate da contrattura bilaterale e simmetrica. Danni a carico dell'occhio sono l'ectopia del cristallino e la miopia conseguente a distacco retinico. Le alterazioni cardiocircolatorie sono le più temibili e spesso rappresentano la causa di morte di questi pazienti; in particolare la debolezza della tunica

media dell'aorta e conseguente dilatazione e aneurisma dissecante rappresentano le anomalie più frequenti (Gray G.R., 1996; Pessier A.P., 1996; Abbas A.K., 2007).

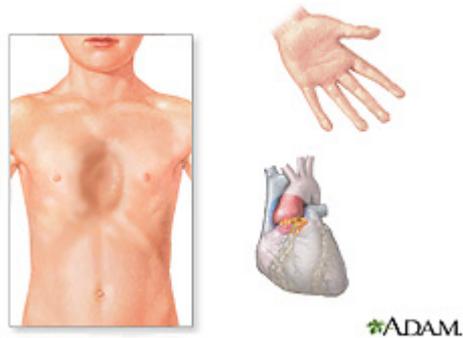


Figura 7: Visualizzazione delle anomalie tipiche della sindrome di Marfan: pectus excavatum, aracnodattilia, dilatazione dell'aorta.

Sebbene le lesioni appena descritte caratterizzino la sindrome di Marfan, bisogna sottolineare che vi è una grande variabilità nell'espressione clinica di questa malattia genetica presumibilmente a causa di mutazioni alleliche all'interno dello stesso locus (Gray G.R.,1996; Tekin M., 2007). Recentemente è stato dimostrato che alla base della patogenesi della sindrome di Marfan sono coinvolti più geni, non solo il FBN1. Le anomalie a carico del FBN1 rappresentano le principali cause genetiche ma non sono le uniche. Sembra infatti che mutazioni a carico dei geni che codificano per il TGFBR1 (mappato sul HSA 9) e per il TGFBR2 (mappato sul HSA 3) siano responsabili del fenotipo Marfan e Marfan correlato. I recettori del TGF β sono localizzati in grande concentrazione nella matrice extracellulare, dove regolano processi di proliferazione e differenziazione cellulare, apoptosi e formazione di matrice extracellulare. L'interazione tra i componenti strutturali della matrice extracellulare di soggetti Marfan e un'aberrante

attività di *signaling* del TGF β sembra essere uno dei meccanismi patogenetici della sindrome di Marfan e sindromi Marfan correlate (Mizuguchi T., 2007).

La fibrillina - 2, la forma omologa della fibrillina - 1, è codificata dal gene FBN2 mappato sul cromosoma 5. Le mutazioni del FBN2 danno origine alla "*aracnodattilia contratturale congenita*" (CCA) una malattia autosomica dominante caratterizzata da anomalie scheletriche. Le anomalie descritte sono in parte simili a quelle identificate nella sindrome di Marfan, mentre altre sono condivise nella osteogenesi imperfetta come grave cifoscoliosi, osteopenia generalizzata, contratture in flessione delle dita e anomalie dei padiglioni auricolari. A differenza della Marfan, non sono state descritte costantemente anomalie a carico dell'apparato cardiovascolare, ma può presentarsi rigurgito aortico spesso di grave entità (Beals R.K., 1971). Allo stato attuale sono conosciute 9 mutazioni del gene FBN2 (Belleh S., 2000).

Un'altra sindrome congenita ereditaria causa nell'uomo quadri clinici simili alla sindrome di Marfan e per questo da porre in diagnosi differenziale, il gruppo delle "*Omocistinurie*". Patologia descritta indipendentemente nel 1962 sia da Caron e Neil che da Gerritsen e coll, viene inquadrata tra le malattie del metabolismo degli aminoacidi solforati e causata dalla carenza di enzimi coinvolti nella transulfurazione. Mutazioni a carico del gene CBS (*ciastationina beta-sintasi*) mappato sul cromosoma 21 sono alla base di questo complesso di malattie ereditarie a carattere autosomico recessivo. L'accumulo sierico di omocisteina in elevate quantità interferisce con il normale *cross-linking* del collagene. La produzione di una sostanza fondamentale e di un collagene anomalo potrebbe essere alla base sia della patologia cardiovascolare che di quella scheletrica ed oculare. Il dato clinico più interessante è la notevole variabilità nell'espressione fenotipica della malattia fatto che giustifica la presenza di più tipi di malattia. Lesioni

oculari quali l'ectopia del cristallino, sono presenti nel 90% dei casi. Il ritardo mentale e le alterazioni scheletriche sono piuttosto caratteristiche e costanti. L'abnorme allungamento delle ossa lunghe, la rigidità articolare, le deformità del rachide e della gabbia toracica sono alla base dell'*habitus marfanoide* (Mudd S.H., 1985). L'ultima transizione (372 C-T) a carico del gene CBS corrisponde alla 16^a mutazione attualmente identificata (Urreitz R., 2007).

Tra le patologie ereditarie caratterizzate da anomalie del metabolismo del collagene occupano grande importanza le sindromi di "*Ehlers-Danlos*" (EDS). Le EDS sono un gruppo eterogeneo di malattie ereditarie che normalmente colpiscono la cute, i legamenti, le articolazioni e i vasi



Figura 8: ipermobilità delle articolazioni associata ad iperelasticità della cute tipico delle sindromi di Ehlers-Danlos

sanguigni. Sono state riconosciute almeno 10 varianti di EDS, classificate in base al modello di ereditarietà e dei segni clinici. Le principali caratteristiche che accomunano le EDS, dal punto di vista clinico, sono pelle

iperestensibile ed articolazioni ipermobili a tal punto che molti contorsionisti sembrano affetti da una delle EDS.

La pelle è inoltre estremamente distesa, fragile e vulnerabile al trauma. La mancanza di tessuto connettivo può comportare serie complicazioni agli organi interni come la rottura del colon e dei grossi vasi arteriosi, fragilità oculare con rottura della cornea e distacco della retina, ernia diaframmatica. Dal punto di vista molecolare, sono stati identificati differenti difetti che variano da mutazioni di geni strutturali per il collagene a quelli che colpiscono enzimi responsabili di modificazioni strutturali post-trascrizionali dell'mRNA codificante per il collagene. Il meccanismo di trasmissione delle EDS comprende tutte e tre le modalità di ereditarietà mendeliana. Ciò non deve sorprendere dato che la biosintesi del collagene è un processo articolato che può essere compromesso da errori genetici che possono colpire uno qualunque tra i molteplici geni strutturali del collagene e degli enzimi necessari per le modificazioni post-trascrizionali del prodotto finale (Beighton P., 1998, Abbas A.K., 2007; OMIM).

1.5 Descrizione della casistica osservata.

Nel periodo compreso tra Novembre 2002 e Marzo 2003, sono stati inviati presso le strutture della Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova i corpi di

| | MADRE | PADRE |
|------------------------|----------------|------------------|
| Vitello A (03.11.2004) | IT022000130220 | Amaranto |
| Vitello B (16.12.2004) | IT022000130215 | Amaranto |
| Vitello C (21.01.2005) | IT050000124779 | Amaranto |
| Vacca (IT021000796769) | ITBZ000308488 | Superbrown Elton |
| Vacca (IT022000130215) | IT022000023838 | Tommy |

Tabella 2: lista dei 3 vitelli SAA e dei 2 soggetti portatori sottoposti allo studio fenotipico e genotipico con relativi genitori.

tre vitelli morti di razza Bruna che mostravano una grave forma di

dimorfismo scheletrico. I vitelli tutti di sesso femminile, sono stati denominati con le lettere A, B e C.

Oltre ai soggetti segnalati nella tabella 1, di cui si disponeva di tessuto cutaneo, altri tre soggetti con fenotipo chiaramente SAA-simile, erano stati segnalati presso la Facoltà di Veterinaria di Padova nello stesso arco di

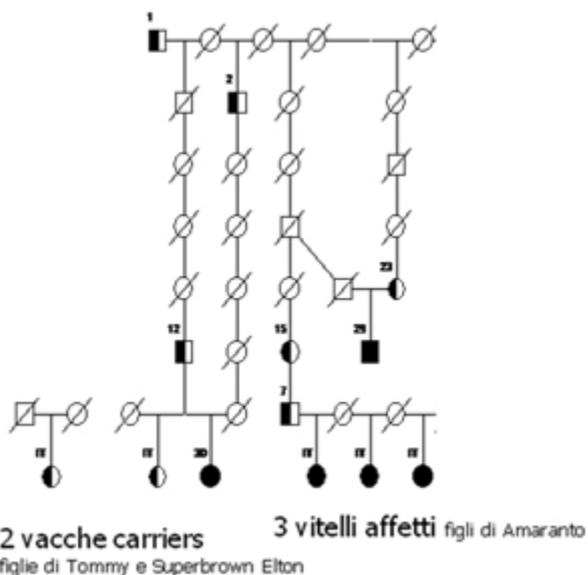


Figura 9: pedigree dei vitelli SAA e carriers descritti in Italia ed ammessi allo studio. Il progenitore comune è Beutician, solo nel caso di una vacca carrier non è stato possibile risalire al progenitore.

tempo. Questi soggetti erano tutti figli del toro Tommy ma non era disponibile materiale biologico. Il DNA dei tori Amaranto e Tommy è stato estratto da campioni di sperma.

1.6 Quadro anatomopatologico.

Il vitello A nato in una stalla in provincia di Bolzano, mostrava già dalla nascita gravi malformazioni scheletriche tanto da indurre il veterinario alla soppressione. Il vitello B proveniente dalla provincia di Modena, era nato con evidenti alterazioni scheletriche che impedivano al vitello di assumere qualsiasi forma di stazione. Movimenti di dondolamento della testa

durante il decubito sternale ed incapacità ad assumere l'alimento latteo avevano caratterizzato gli unici due giorni di vita dell'animale, poi deceduto in maniera spontanea. Il vitello C nato in provincia di Bologna, presentava anch'esso marcato dimorfismo scheletrico, è deceduto dopo pochi minuti dal parto.



Figura 10: vitello di razza Bruna affetto da SAA affetto al DCV, da notare le gravi malformazioni scheletriche.

Una prima valutazione ispettiva rilevava un costante ed evidente incurvamento della linea del dorso che conferiva ai vitelli un "aspetto rannicchiato". Gli arti erano nettamente più lunghi e sottili del normale, quelli posteriori distalmente all'articolazione tarsica, avevano perso la normale disposizione anatomica, incurvandosi verso l'avanti. L'articolazione del garretto era quasi completamente bloccata in semi-flessione, mentre quella del nodello era abnormemente estesa con angolo craniale metatarso-falangeo chiuso a 90° e asse falangeo rivolto cranio-dorsalmente. Al dimorfismo scheletrico si associava una grave atrofia muscolare.

Nei soggetti A e C, la testa appariva più piccola del normale e la mandibola risultava di circa 3-4 cm più corta del mascellare superiore. La regione fronto-nasale presentava un profilo concavo, mentre il musello, sottile ed affusolato era deviato in senso dorsale e lateralmente verso sinistra.

Nel vitello B, la testa era di grosse dimensioni e le ossa nasali erano deviate verso destra, rispetto al piano sagittale mediano.

L'anomalia nella lunghezza degli arti era dovuta principalmente all'abnorme allungamento della porzione diafisaria del metacarpo e del metatarso. In queste ossa l'assottigliamento aveva coinvolto prevalentemente la cavità midollare dimostrato anche dalla misurazione del diametro diafisario dorso-palmare del metatarso del vitello C pari a 10 mm con cavità midollare pari a 2 mm. In un soggetto normale della stessa razza ed età, il diametro diafisario misurava 17 mm con larghezza della cavità midollare pari a 10 mm.

Le epifisi non erano colpite da alcuna anomalia macroscopica.

L'anchilosi delle articolazioni era dovuta non ad un difetto a carico delle articolazioni, bensì ad un accorciamento dei tendini muscolari.

All'esame anatomopatologico degli organi interni si rilevava broncopolmonite purulenta nel vitello B mentre anomalie cardiache caratterizzavano il vitello C. In particolare si notava una completa trasposizione dei tronchi arteriosi ed un'ipertrofia concentrica dei ventricoli evidente soprattutto a sinistra.

I genitori dei soggetti malati segnalati erano clinicamente sani; per altro due madri erano ancora in vita nel periodo dello studio.

1.7 Lo studio del genotipo SAA.

Il pedigree dei soggetti SAA ha permesso di formare 3 distinte famiglie tutte correlate tra loro mediante il comune antenore: il toro Bruno "Norvic

Lilasons Beautician”; ai 3 soggetti descritti in Italia, sono stati aggiunti anche 2 vitelli malati segnalati alla Facoltà di Medicina Veterinaria di Berna e 3 a quella di Zurigo. I soggetti descritti in Svizzera sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico presso le rispettive strutture. Ai soggetti SAA sono stati aggiunti 19 portatori sani (carriers) tra cui alcuni genitori; la veridicità della parentela diretta è stata confermata in laboratorio mediante genotipizzazione utilizzando markers proposti dalla USDA-MARC (www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle).

I soggetti di razza Bruna utilizzati come controllo erano 5. Gli animali malati sono stati raggruppati in 3 famiglie distinte, tutte accumulate dal toro Beautician. La formazione di famiglie è stata possibile grazie alla disponibilità di informazioni dettagliate e del DNA dei predecessori di ciascun malato. Poter disporre di un sicuro pedigree per ogni soggetto SAA

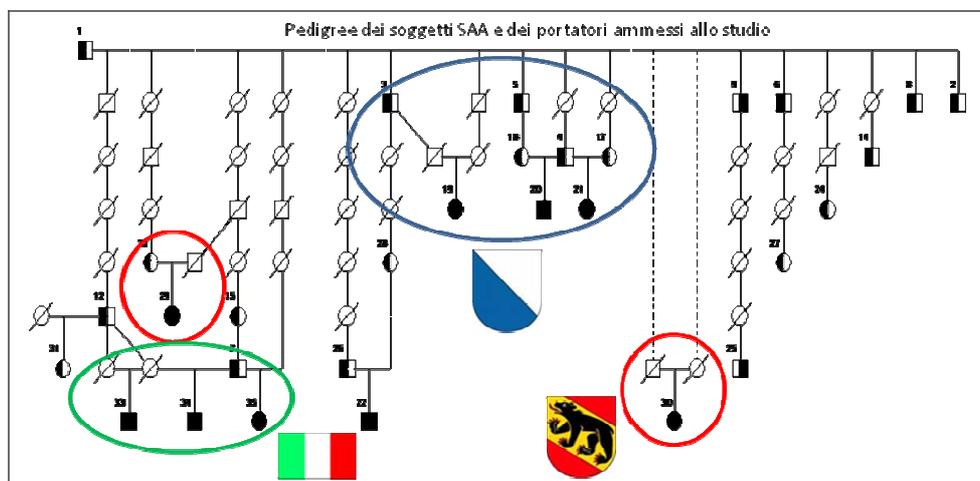


Figura 11: pedigree SAA con relative famiglie dei soggetti ammessi allo studio provenienti da Italia, Berna e Zurigo. Tutti i soggetti hanno un unico progenitore, il toro Beautician (1).

ha permesso di confermare con sicurezza il genotipo di ogni malato, di confermare il carattere ereditario della malattia, di ipotizzarne il modello di ereditarietà e di definire la penetranza dell'allele malato. In aggiunta, l'organizzazione di un pedigree per ciascuna famiglia ha permesso di

riconoscere genotipi informativi per gli alleli polimorfici, basilare per l'identificazione di un aplotipo.

1.8 Lo studio del genoma dei vitelli SAA.

Il DNA genomico dei soggetti portatori clinicamente sani e degli animali di controllo è stato estratto da campioni di sangue EDTA e di sperma, conservati a – 20°C. Sono invece stati utilizzati campioni di tessuto cutaneo per l'estrazione del DNA dei soggetti SAA. Anche questi campioni erano stati conservati a – 20°C. La metodica di estrazione e purificazione del DNA è stata quella consigliata dalla QIAamp® mediante mini kit (DNA Mini Kit, Quiagen®, Hilden, Germania).

L'approccio di studio che è stato applicato alla SAA si è basato sull' "osservazione" di alleli nell'intero genoma mediante markers applicato a tutti i soggetti delle varie famiglie (*family-based linkage study across the entire genome*). La genotipizzazione è stata ottenuta mediante l'uso di microsatelliti-markers, sequenze genomiche che identificano loci da cui è possibile "osservare" gli alleli.

Analizzando i dati forniti dal pedigree ed il numero di casi segnalati negli anni, abbiamo considerato la SAA una tara ereditaria a carattere autosomico recessivo monogenica a penetranza completa. Ipotizzando un modello recessivo e avendo un unico progenitore per tutti i casi, abbiamo considerato che ogni marker legato al difetto, dovesse essere omozigote per lo stesso allele negli animali malati (aplotipo) e di mostrare una combinazione eterozigote nei soggetti carriers. Combinazioni svariate di differenti alleli si sarebbero dovute ottenere nel caso di animali sani non portatori. Obiettivo dell'indagine è stato quello di identificare un aplotipo che accumulasse tutti i soggetti SAA e che fosse riconoscibile anche nei soggetti portatori (co-segregazione). Tutti i soggetti sono stati genotipizzati

mediante l'uso di microsatelliti altamente informativi, "marcati" a fluorescenza specifici della specie bovina e della specie ovina. In totale sono stati testati 258 microsatelliti sui 29 cromosomi del bovino (BTA), questo ha permesso di mantenere una distanza media tra i markers di 9,3 cM.

Questo set di markers ha permesso di identificare una regione situata sul

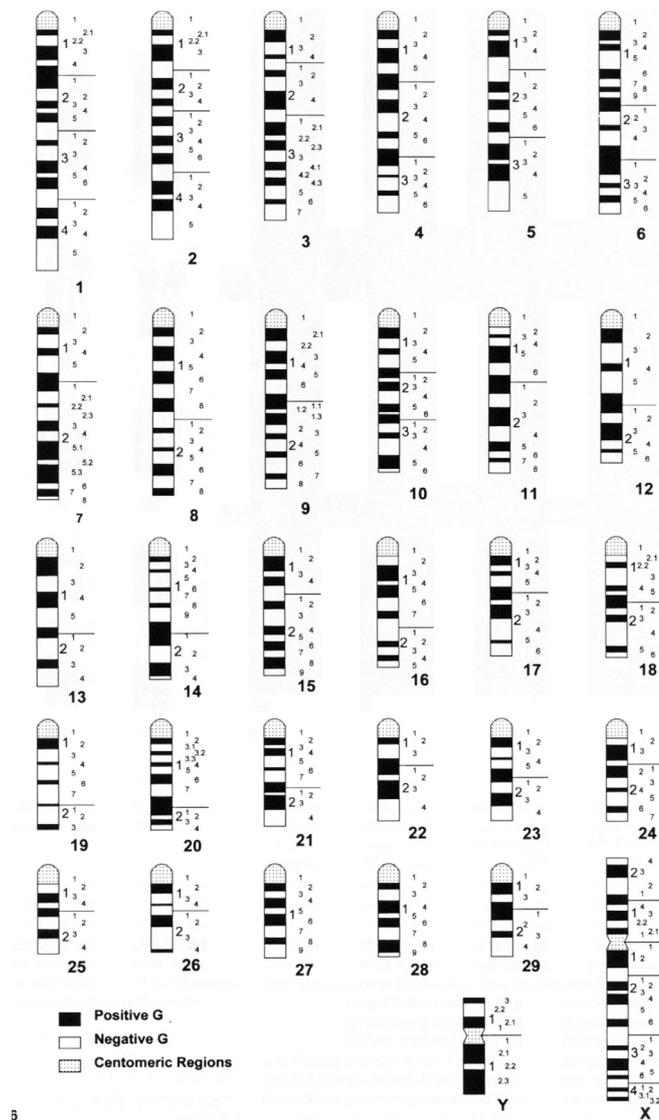


Figura 12: "Whole genome scan" eseguito su 32 animali.

BTA 5 come il tratto genomico a maggior probabilità di essere *linked* con il

gene mutato. L'aggiunta di 9 nuovi markers (SAA 001, SAA11..), alcuni dei quali sono stati selezionati direttamente consultando le più recenti mappe genetiche del bovino disponibili online: ha permesso di ridurre il campo di ricerca ad una regione più ristretta e più vicina al gene (*fine mapping*). I markers sono stati identificati e scelti consultando la banca dati disponibile online ai siti: www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/cow/, www.marc.usda.gov, www.thearkdb.org, www.locus.jouy.inra.fr.

I markers sono stati amplificati mediante la tecnica di *Polymerase Chain Reaction* (PCR) il cui protocollo, leggermente modificato era quello proposto dalla Quiagen® per PCR multiple standard:

| Componente | Volume | Concentrazione finale |
|----------------------------------|-------------|-----------------------|
| 2X Quiagen® PCR Master Mix | 25 µl | |
| 10-15 X primer mix (10 pmol/ µl) | 0.1-0.15 ml | 0,1 µM |
| Q solution Quiagen® | 1 ml | |
| Acqua RNA free | Variabile | Variabile |
| DNA genomico | 1 µl | 25 µg/ µl |
| Volume totale | 50 µl | |
| Protocollo PCR | | |
| Fase | Tempo | Temperatura |
| Denaturazione | 15' | 95° C |
| Annealing X 30 | 30" | 94° C |
| | 1' | 60° C |
| | 45" | 72° C |
| Estensione finale | 30' | 60° C |

Tabella 3: protocollo PCR

L'analisi dei markers è stata eseguita mediante due analizzatori/sequenziatori di DNA, ABI PRISM 3100 e ABI 3750 Hitachi®/Applied Biosystems®, mentre la lettura del genotipo è stata eseguita grazie all'ausilio del software *Gene Mapper*® v.40 (Applied Biosystems®, Foster City, CA).

L'identificazione di una regione bersaglio sul BTA 5 è stata possibile grazie all'impiego del software Merlin (Abecasis G R., 2002) che ha evidenziato un linkage per dati parametrici altamente significativo tra il fenotipo SAA e i



Figura 13: visualizzazione mediante Gene Mapper® del genotipo di 5 animali SAA per un determinato marker. Solo il soggetto in posizione 2 è omozigote.

markers BRXX e EXXX (linkage tra markers e malattia).

I soggetti utilizzati come controllo hanno mostrato una varietà di alleli molto alta con una percentuale di "omozigosi" molto inferiore per ognuno dei markers mappati sul BTA 5. Alla luce dei dati ottenuti dalla

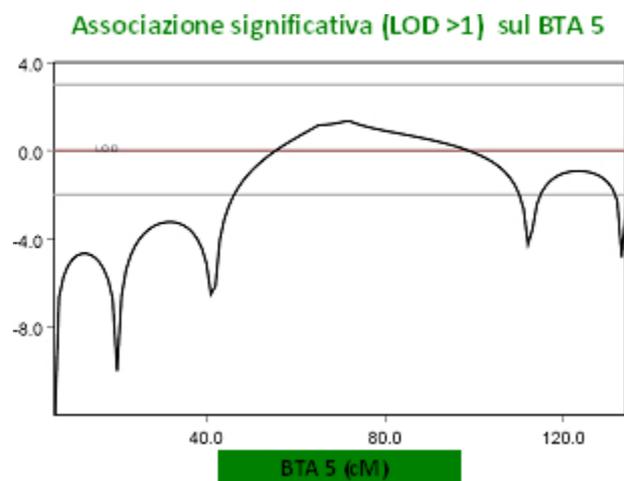


Figura 14: il LOD score > di 1 indica l'alta probabilità di associazione tra un pool di markers mappati sul BTA 5 e il fenotipo SAA.

La presenza di soggetti portatori con genoma informativo ha permesso di

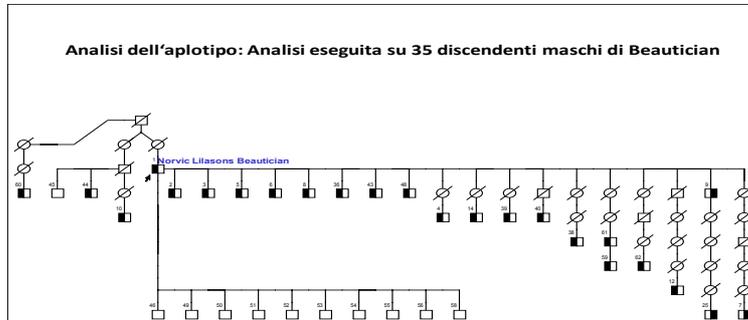


Figura 16: pedigree dei soggetti consanguinei con l'ancestro utilizzato per lo studio dell'aplotipo

restringere l'estensione dell'aplotipo e di conseguenza ridurre la regione bersaglio a 6,5 Mb.

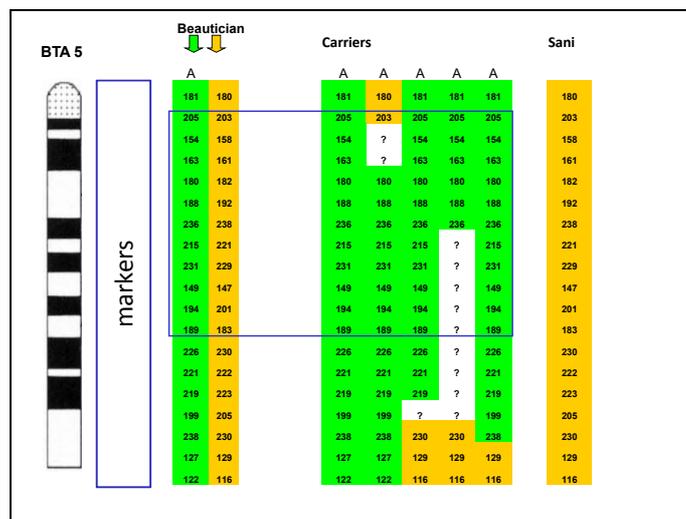


Figura 17: visualizzazione del genotipo dei carriers paragonabile a quello di Beautician ma completamente diverso dai soggetti sani consanguinei non portatori dell'allele SAA.

1.9 Conclusioni.

La SAA è una patologia congenita dei vitelli di razza Bruna conosciuta da molti anni, tuttavia la carenza di informazioni in merito all'eziologia ci ha

consentito di poterla definire una nuova malattia genetica. Lo studio fenotipico e genotipico, riportati in questa tesi, hanno permesso di classificare la SAA della razza Bruna tra le malattie ereditarie a carattere autosomico recessivo a penetranza completa. Il locus malattia è localizzato sul BTA 5.

L'identificazione di un pool di markers informativi associati al fenotipo SAA, ha permesso di mettere a punto un test genetico indiretto a disposizione dei veterinari e delle associazioni di razza. La possibilità di sfruttare questo test ha permesso di avvalersi di uno strumento diagnostico valido e quindi di poter stimare con più affidabilità l'incidenza della malattia nella popolazione Bruna europea. Altro fondamentale contributo è l'utilizzo del test come strumento nella lotta all'eradicazione della SAA dalla popolazione. L'identificazione dei malati e la conseguente individuazione dei carriers, comporterà un maggior controllo in sede riproduttiva. L'esclusione dai centri di monta dei riproduttori maschi portatori è una delle conseguenze più efficaci per avviare l'eradicazione di questa tara ereditaria. La ricerca tuttavia non ha concluso il suo compito dal momento che la ridotta casistica non ha permesso di ridurre adeguatamente il tratto cromosomico bersaglio per poter individuare un numero limitato di geni candidati responsabili della SAA. Obiettivo del futuro sarà quello di riuscire a collezionare altra casistica per fornire ai ricercatori materiale genetico di fondamentale importanza per identificare il gene SAA.

2 LA PSEUDOMIOTONIA CONGENITA DELLA CHIANTINA (PMT).

Analogamente a quanto osservato nell'uomo, si stanno riscontrando sempre più numerose anche negli animali domestici, alterazioni muscolari ereditarie che possono manifestarsi o al momento della nascita oppure tardivamente dopo mesi o anni.

Spesso si hanno strette interconnessioni con il sistema nervoso che può partecipare in modo decisivo all'insorgenza delle lesioni. Nel gruppo delle miopatie congenito-ereditarie rivestono grande importanza le sindromi miotoniche, disturbo generalizzato o localizzato a carico della funzione muscolare volontaria, caratterizzato da contrazioni incoercibili e prolungate e, quindi, da ritardata decontrazione. Il fenomeno fisiopatologico delle miotonie è quindi caratterizzato da rigidità muscolare temporanea non controllata dovuto ad ipereccitabilità transitoria delle superfici di membrana delle cellule muscolari scheletriche. I malati di miotonia, in genere, manifestano vari gradi di rigidità

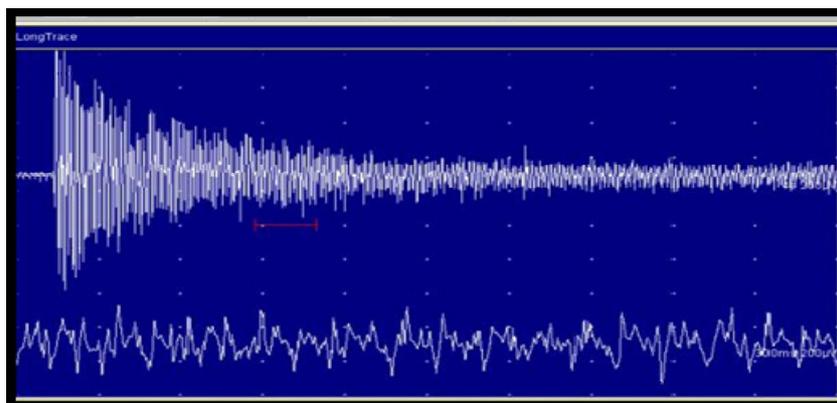


Figura 18: Pattern elettromiografico di miotonia percussoria, tipica della miotonia congenita

muscolare dopo uno sforzo; questo sintomo recede se l'esercizio muscolare viene continuato. Clinicamente si manifesta con perdita del rilassamento muscolare dopo la stimolazione meccanica (*miotonia percussoria*) o la contrazione volontaria (*miotonia attiva*) (McGavin M.A., 2001; Marcato PS, 2002).

Alla base della miotonia si esplica un malfunzionamento dei canali ionici del

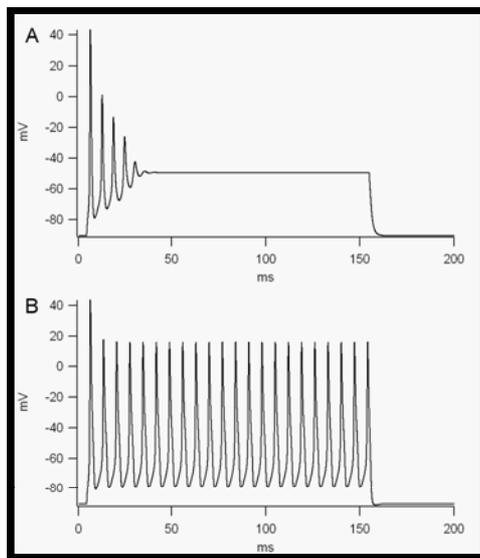


Figura 19: A. EMG, potenziale d'inserzione seguito da assenza di attività spontanea in un muscolo normale. B. EMG, potenziale d'inserzione seguito da una scarica di potenziali d'azione in un muscolo colpito da miotonia.

sarcolemma che determina un'ipereccitabilità e un'abnorme produzione di depolarizzazioni ripetitive seguite da ripolarizzazione e rilasciamento ritardato.

La miotonia classica si manifesta con un miglioramento nel rilassamento muscolare in seguito ad esercizio (*warm up*) che si ottiene dopo le prime tre, quattro contrazioni successive. Patologie caratterizzate da miotonia sono diagnosticate mediante

l'elettromiografia (EMG) che registra l'attività elettrica ripetitiva di singole fibre muscolari (*potenziali di fibrillazione*).

Differentemente si distingue la paramiotonia dalla miotonia in quanto la contrattura muscolare si aggrava all'aumentare dell'attività fisica e si accentua in presenza di freddo. Con il termine pseudo miotonia, invece, si distingue un fenomeno patologico clinicamente simile alla miotonia (*ipertonica muscolare*) ma non associato ad alterazioni dell'attività elettrica

del muscolo a riposo e sotto sforzo rilevabili all'EMG (Rüder R., 1994; Lehmann-Horn F., 1994; Douglas C., 2005).

Sebbene già da tempo presente nella esperienza e nella memoria dei buiatri operanti sulla razza Chianina, una nuova malattia congenita, che da

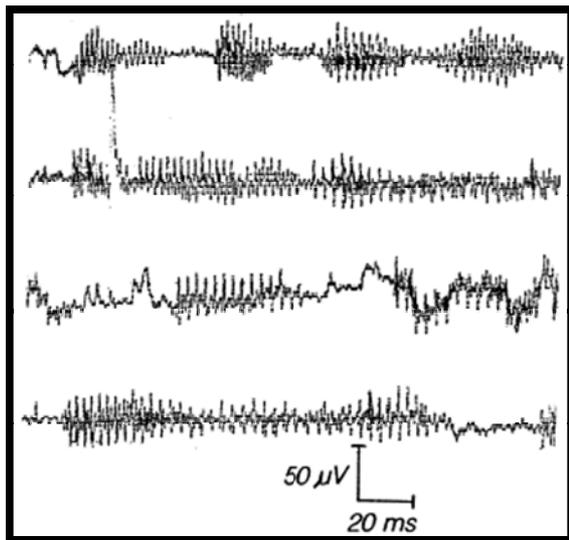


Figura 20: un esempio di potenziale spontaneo in un muscolo affetto da miotonia (Montagna P., 2001).

qualche anno è oggetto di maggior interesse e preoccupazione per allevatori, associazioni di razza (ANABIC) e veterinari si sta manifestando con maggior incidenza all'interno della popolazione Chianina. La recente segnalazione e descrizione della Pseudomiotonia non ha permesso di raccogliere

informazioni sufficientemente rappresentative della frequenza di manifestazione della malattia sull'intera popolazione Chianina italiana, tant'è che, allo stato attuale, non è possibile stimare la frequenza dell'allele PMT.

Le speculazioni diagnostiche cui erano costretti i veterinari, chiamati a darne spiegazione agli allevatori, avevano per lo più ruotato intorno a non precisate sindromi neuro-muscolari, alle quali tuttavia, anche quando si era fatto ricorso ad indagini istopatologiche, non si era mai riusciti a dare alcun orientamento diagnostico.

Lo studio dei pedigree degli animali ammessi allo studio, ha mostrato stretti legami di parentela che hanno consentito di ipotizzare la natura ereditaria della malattia.

Il particolare tipo di distribuzione all'interno della parentela degli animali ammalati e l'omogeneità dell'espressione fenotipica del difetto hanno suggerito di sospettare una trasmissione monogenica mendeliana.

Lo spettro della natura ereditaria, in una razza pregiata ma numericamente ridotta (50.000) e rappresentativa del patrimonio buiatico italiano, ha portato il Prof Gentile ad inserire la malattia fra le priorità di interesse di studio.

2.1 Cenni di anatomia e fisiologia della contrazione muscolare scheletrica.

Il tessuto muscolare striato costituisce circa il 40% della massa corporea nei mammiferi. Le cellule muscolari striate sono tra le più grandi cellule presenti nell'organismo raggiungendo, nei mammiferi, fino a 30 e più cm di lunghezza e spessori di frazioni di mm. Ogni fibra muscolare è formata da migliaia di fibrille che decorrono da un capo all'altro della fibra e da unità funzionali di contrazione chiamati sarcomeri. Ogni miofibrilla è quindi costituita da un gran numero di sarcomeri disposti in serie e separati tra loro da molecole di actinina che assicura il corretto assemblaggio di filamenti proteici sottili. All'interno di ogni sarcomero sono distinguibili due popolazioni di filamenti, ordinatamente disposti a formare un reticolo a simmetria esagonale: i filamenti spessi, formati da miosina e quelli sottili costituiti da actina. A seconda del grado di contrazione del muscolo varia il grado di sovrapposizione tra i filamenti.

L'actina e la miosina sono indicate come le proteine contrattili nonostante mantengano una dimensione costante per tutto il ciclo. Un filamento di actina è costituito da due polimeri intrecciati ad elica e accoglie all'interno del suo incavo una molecola filamentosa elicoidale di tropomiosina. Su questo asso di tropomiosina, si trovano due molecole di troponina,

proteina globulare che possiede un sito Ca^{2+} sensibile. I filamenti spessi sono costituiti di molecole di miosina. Ogni molecola ha forma di bastoncello con un'estremità globosa che forma delle protrusioni sulla superficie del filamento spesso, le quali rappresentano i ponti trasversali con cui i filamenti di miosina si agganciano, al momento della contrazione, ai filamenti di actina formando il complesso actomiosina. Per poter comprendere il meccanismo della contrazione, occorre considerare il sistema T e il reticolo sarcoplasmatico della fibra muscolare. Il sistema T, o trasversale, è rappresentato da invaginazioni del sarcolemma che, all'interno della fibra, si ramificano e si anastomizzano formando una rete nelle cui maglie si trovano le miofibrille. La funzione chiave del sistema T è quella di intervenire nella trasmissione del segnale dalla membrana cellulare ai siti di rilascio del calcio situato nel reticolo sarcoplasmatico (RS). Il RS è un sistema interno di membrane che forma una rete continua di tubuli disposti longitudinalmente, rispetto all'asse della fibra tra le miofibrille. Il sistema contrattile delle fibre muscolari scheletriche si attiva quando la concentrazione del Ca^{2+} intracellulare è superiore a 10^{-6} M e si inattiva quando essa scende al di sotto di $0,1 \mu\text{M}$. Nelle fibre muscolari striate, la quantità di calcio che penetra durante l'eccitamento è troppo piccola e, comunque diffonde troppo lentamente per essere responsabile dell'attivazione meccanica. In queste fibre, che sono rapide e di grandi dimensioni, il calcio attivatore viene rilasciato e recuperato dal reticolo sarcoplasmatico. Questi tubuli longitudinali terminano in sacchi chiusi, le cisterne terminali o laterali. In certi tratti queste strutture vescicolari risultano giustapposte alle membrane dei tubuli a T che sono orientati perpendicolarmente al sistema dei tubuli longitudinali e circondano le miofibrille. Circa il 60% delle membrane dei tubuli sono in intimo contatto con le membrane delle cisterne terminali del RS. L'estensione e

l'organizzazione spaziale del RS e dei tubuli a T variano moltissimo a seconda del tipo di muscolo preso in esame, per esempio è estremamente sviluppato nei muscoli particolarmente rapidi mentre è assai ridotto nei muscoli che hanno fibre sottili e si contraggono lentamente. Una stretta relazione lega l'attività del RS e la velocità di rilasciamento del muscolo. In particolare è dimostrato che le vescicole di RS di un muscolo a rapida contrazione sono in grado di immagazzinare molto più calcio e idrolizzano ATP molto più rapidamente. La più elevata attività di sequestro esibita dal RS del muscolo rapido era dovuta al fatto che in queste membrane l'ATPasi di trasporto (SERCA) degli ioni Ca^{2+} dal mioplasma verso l'interno del RS è molto più abbondante che nel RS del muscolo lento. Il SERCA infatti, costituisce l'80% del contenuto proteico delle fibre rapide contro il 20% delle fibre lente. Il SERCA1 è tra le pompe per il trasporto del Ca^{2+} maggiormente studiata dal punto di vista strutturale e funzionale. La sua funzione è quella di trasferire ioni Ca^{2+} dal citoplasma al reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari a contrazione rapida. Questa attività prevede il consumo di ATP; il trasferimento di due ioni comporta l'idrolisi di una molecola di ATP e il trasferimento di ioni H^+ (Camino E., 2004; Rossi A.E., 2006).

Strutturalmente il SERCA1 è costituito da tre domini citoplasmatici denominati: attuatore, nucleotidico e fosforilato, 10 eliche transmembrinarie-M e anelli di varia lunghezza. I siti deputati al legame con il Ca^{2+} sono localizzati nel dominio transmembranario della proteina tra le eliche M4, M5, M6 e M8. La grossa porzione dell'enzima che sporge nel citoplasma, veicola i siti di regolazione da parte di molti modulatori e il sito di legame per l'ATP con il sito di fosforilazione (*Asp 351*) a cui viene trasferito il fosfato prodotto dall'idrolisi dell'ATP. In seguito alla fosforilazione del SERCA, i siti di trasporto del Ca^{2+} si modificano.

Nell'enzima non fosforilato, il sito ad alta affinità per il Ca^{2+} , accessibile dal lato citoplasmatico, lega in modo cooperativo due ioni Ca^{2+} , quindi viene scisso l'ATP e il P_i viene trasferito al sito di fosforilazione con un legame ad alta energia. Questa energia serve per promuovere dei cambiamenti di conformazione della proteina cosicché i siti per il Ca^{2+} si trasformano in modo sequenziale in siti a bassa affinità rivolti sul lato opposto e i due ioni Ca^{2+} vengono rilasciati nel lume del reticolo.

A questo punto la pompa libera il P_i e ritorna nella conformazione iniziale.

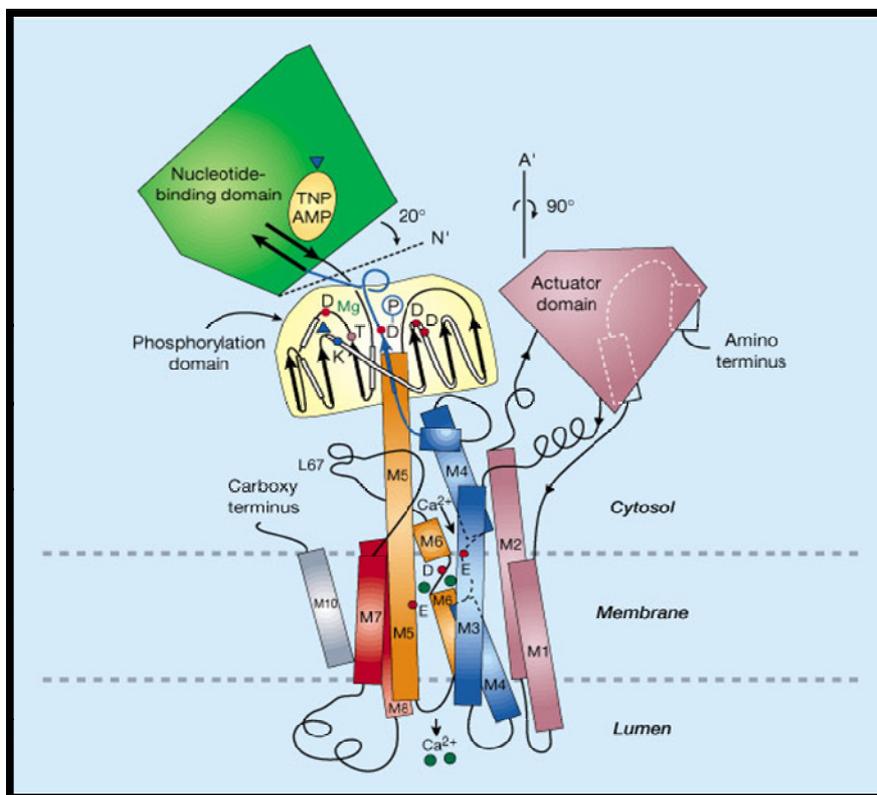


Figura 21: struttura del SERCA1; in evidenza i due siti di legame del Ca^{2+} , il sito di fosforilazione, il dominio attuttore (MacLennan, Green, 2000).

L'attivatore fisiologico della pompa di Ca^{2+} è il calcio stesso presente nel mioplasma; quando all'attivazione della contrazione, la concentrazione di calcio aumenta, aumenta vistosamente anche l'attività di recupero verso il

RS (MacLennan D.H., 1985; MacLennan D.H. 2000). La modulazione Ca^{2+} -dipendente è mediata dalla calmodulina che si lega a specifici siti regolatori nel dominio citoplasmatico dell'enzima (Rossi A.E. 2006). Modulatori della pompa sono anche i nucleotidi ciclici (GMPc, AMPc) ed una piccola proteina detta fosfolambano (MacLennan D.H. 2000; MacLennan D.H., Green N.M. 2000).

Nel muscolo normale, il processo di contrazione e rilassamento è regolato dalla liberazione di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico al citoplasma. In particolare, la depolarizzazione transmembranaria causata dall'ingresso di Na^+ e fuoriuscita di K^+ dalla cellula, induce il rilascio di Ca^{2+} dai tubuli sarcoplasmatici determinando un aumento di 500 volte della concentrazione di Ca^{2+} citoplasmatico.

Una volta che gli ioni Ca^{2+} sono stati rilasciati e diffondono tra le miofibrille, si legano al filamento sottile della troponina sciogliendo il vincolo tra actina e miosina in modo da permettere la contrazione muscolare.

Il Ca^{2+} viene poi immagazzinato nuovamente nel lume del reticolo sarcoplasmatico mediante il SERCA1 e permettere il rilassamento della fibra muscolare. La durata media di questo "transiente" di Ca^{2+} dura 1/20 di secondo (Camino E., 2004).

2.2 Casistica osservata presso il Dipartimento Clinico Veterinario di Bologna.

La casistica su cui si è basato lo studio della PMT è stata di 15 soggetti, 6 dei quali ricoverati presso le strutture del Dipartimento Clinico Veterinario dell'Università di Bologna per un monitoraggio più costante e prolungato nel tempo.

| N.rif. | Sesso | Data di nascita | Data ricovero | Esito al 31.12.07 |
|--------|-------|-----------------|---------------|-------------------|
| 130/04 | F | 27/05/04 | 05/11/04 | Soppresso |
| 131/04 | M | 14/04/04 | ----- | Macellato |
| 135/05 | M | 05/12/04 | 15/09/05 | Macellato |
| 94/06 | F | 02/06/05 | ----- | Deceduto |
| 95/06 | F | 28/04/05 | ----- | Macellato |
| 115/06 | M | 02/09/06 | ----- | Vivente |
| 117/06 | F | 14/03/06 | 02/10/06 | Soppresso |
| 118/06 | M | 20/02/06 | 02/10/06 | Macellato |
| 129/06 | M | 03/05/05 | ----- | Macellato |
| 135/06 | F | 18/11/06 | ----- | Vivente |
| 103/07 | M | 28/04/07 | ----- | Vivente |
| 156/07 | M | 30/05/07 | 25/10/07 | Vivente |
| 167/07 | F | 09/10/07 | 25/10/07 | Deceduto |
| 181/07 | M | 22/11/07 | ----- | Vivente |
| 182/07 | F | 22/12/07 | ----- | Vivente |

Tabella 4: casi di PMT studiati

Si tratta, in tutti i casi, di soggetti di razza Chianina, 8 maschi e 7 femmine, con anamnesi uniformemente caratterizzata da difficoltà di deambulazione sin dalla nascita.

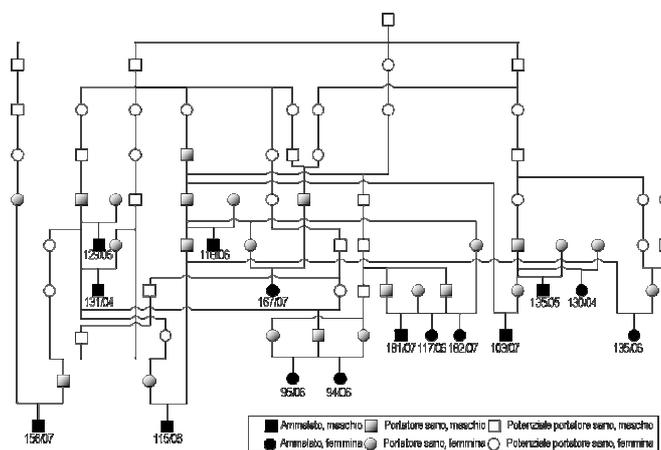


Figura 22: pedigree dei soggetti PMT ammessi allo studio.

A questa casistica sono da aggiungere 20 ulteriori segnalazioni che, nonostante l'affidabilità dei referenti e la piena sovrapposizione

sintomatologica di quanto riportato, non sono state incluse nel materiale utile alle indagini.

2.3 Quadro clinico della PMT.

Si tratta di una forma congenita, non progressiva, caratterizzata da uno stato di contrattura generalizzata della muscolatura scheletrica che compare quando l'animale compie un movimento brusco o quando è sottoposto ad un piccolo/medio sforzo (passo veloce, cambio improvviso di direzione).

L'irrigidimento muscolare "blocca" l'attività muscolare nella sua fase di esecuzione (contrazione), non consentendo di essere portato a termine (ciclo contrazione-rilassamento) e causando un'andatura incespicante o saltellante fino a provocare la caduta del soggetto in stato simil tetanico.

Accortosi della difficoltà a proseguire lo sforzo l'animale tende a limitare spontaneamente la sua attività, evitando accelerazioni e movimenti rapidi.

In questo caso il soggetto riesce a prevenire crisi crampiformi. Se però l'animale è costretto o per evenienza spontanea o per prolungata stimolazione a muoversi rapidamente o a continuare la corsa, ecco che, completamente bloccato ("inchiodato") nei movimenti, "stramazza" al suolo, senza possibilità alcuna di difesa.

La caduta può provocare un ulteriore spavento all'animale che se stimolato ad alzarsi rapidamente si irrigidisce nuovamente e ricade a terra. Se invece all'animale è consentito di rilassarsi e di alzarsi tranquillamente e lentamente, allora esso recupera la stazione come se nulla fosse successo.

Se condotto a passo lento l'animale non mostra alcuna crisi crampiforme, ne mostra alcun segno di affaticamento, anche in caso di una lunga "passeggiata". In stazione, così come durante una deambulazione a passi lenti e regolari, gli animali non mostrano alcun segno, ed il loro tono e



Figura 23: sequenza di una crisi crampiforme in un soggetto affetto da PMT

trofismo muscolari risultano pienamente nella norma. Un suolo scosceso, la presenza di ostacoli, od anche una salita o una discesa, sono in grado di provocare l'irrigidimento della muscolatura e la conseguente caduta. Gli animali si irrigidiscono anche se vengono spaventati; in questo caso caratteristica è la retrazione del bulbo oculare e la procidenza della terza

palpebra. L'episodio contratturale è temporaneo e si risolve spontaneamente e completamente nel giro di pochi secondi.

I sintomi sono presenti sin dalla nascita e rimangono pressoché invariati per tutta la vita dell'animale. Sebbene gli indici di accrescimento siano penalizzati, i soggetti possono raggiungere un peso utile per la macellazione (Testoni S., 2007).

2.4 Quadro ematobiochimico.

Mentre il quadro emato-morfologico e quello protidemico non presentano alcuna deviazione dalla norma, il profilo biochimico sottolinea le sofferenze a carico del tessuto muscolare che tendono ad aggravarsi nei soggetti sottoposti a ripetuti sforzi. Nella casistica disponibile, gli enzimi AST, CK e LDH hanno raggiunto livelli rispettivamente pari a 8.000 UI/L (valore di riferimento <130 UI/L), 470.000 UI/L (<200 UI/L) e 8.000 UI/L (<1500 UI/L). Le concentrazioni sieriche degli enzimi LDH e CPK di soggetti sani della stessa età e razza dei pazienti PMT è al di sopra dei valori classici di riferimento per il bovino: CPK (media di 330 UI/L) e LDH (media di 2700 UI/L).

| BOVINO PMT | Età | CK (105-409) | AST (43-127) | LDH (697-1445) | LATTATO | Note |
|-----------------------|------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------|-----------------------------|
| 118/06 M | 7 m | | | | 0,9 | Ingresso in clinica |
| | | 868 | 175 | 2838 | 1 | |
| | | | | | 1,0 | |
| | | | | | 9,8 | dopo 20 minuti di movimento |
| | | | | | 3,8 | dopo 1 ora di riposo |
| | | 1441 | 162 | | | |
| | | | | | 0,6 | |

| | | | | | | |
|--|--|--|------|-------|---|---|
| | | 641 (T0) 717 (T60) 770 (T120) | | | 0,7-2,8- 2,9-2,6- 4,0-3,2- 2,5-1,2-0,4 | prova da sforzo mattina |
| | | | | | 0,6-1,1 | pomeriggio T0-T10 minuti |
| | | | | | 1,6-1,4 | sera T0-T10 |
| | | 851 | | | 0,8-1,5- 0,6-1,3- 1,9-1,8 | prova da sforzo mattina (alternanza di T0-T10) |
| | | 704 | | | 0,8-1,6- 1,1-1,5- 1,2-1,4 | prova da sforzo mattina (alternanza di T0-T10) |
| | | 670 | | | 0,5-1,6- 1,3-2,9- 1,5-1,1 | prova da sforzo mattina (alternanza di T0-T10) |
| | | 722 | | | 0,8-1,2 | T0-T10 |
| | | | | | 0,7-0,8 | T0-T10 |
| | | 1212 | | | | |
| | | 705 | 107 | 2407 | 0,9 | |
| | | | | | 0,4 | T0 mattina |
| | | | | | 4,7 | T15 mattina |
| | | | | | 1,2 | T0 ora pranzo |
| | | | | | 2,4 | T15 ora pranzo |
| | | | | | 1,2 | T0 sera |
| | | | | | 2,4 | T15 sera |
| | | | 688 | 15975 | | |
| | | | | | 0,5 | T15 |
| | | 1071 | 159 | 2589 | 0,7 | Dopo breve passeggiata |
| | | 344300 | 2970 | | | |
| | | 11910 | 1372 | | | |
| | | 2337 | 249 | 2440 | | |

Tabella 5: andamento delle concentrazioni degli enzimi muscolari e del lattato in un soggetto PMT. Valori di riferimento: Large Animal Internal Medicine (Smith B.P., 2002).

A quanto sopra va aggiunto il comportamento del lattato levogiro, che da livelli fisiologici (< 2mmol/l) “a riposo”, si innalza rapidamente (fino anche a 8 mmol/l) a seguito di esercizio muscolare accompagnato dal ripetersi di episodi contratturali. L’esame sierologico e virologico per BVD e *Neospora Caninum* è risultato negativo in quattro soggetti ricoverati in clinica.

2.5 Quadro elettromiografico.

L'esame elettromiografico (EMG) è stato eseguito su due soggetti in stazione, non sedati ma solo leggermente trattenuti. E' stata innanzitutto valutata l'attività spontanea a cui è seguito lo studio dell'attività elettrica muscolare evocata durante la deambulazione e durante un semplice sforzo muscolare. I potenziali elettrici sono stati analizzati in relazione alla: durata, ampiezza, forma e frequenza di scarica. Successivamente al fine di valutare la trasmissione neuromuscolare, gli animali sono stati posti in decubito laterale dopo essere stati anestetizzati e sono state applicate stimolazioni ripetitive (3 Hz e 5 Hz) sul nervo peroneale sinistro utilizzando un ago elettrodo monopolare inserito vicino al nervo. Il protocollo anestesilogico è stato il seguente:

- Xilazina: 0,025 mg/kg IV;
- Butorfanolo: 0,5 mg/Kg IM
- Ketamina: 3 mg/Kg IV; Boli di mantenimento da 2 ml IV.
- Isoflurano 3% associato a 30 ml/Kg di O₂.

L'esame elettromiografico eseguito a riposo sui muscoli tricipite surale, semitendinoso, gluteobicipite, gastrocnemio e la massa comune tocolombare, non ha evidenziato alcuna attività spontanea. Non appena il soggetto è stato stimolato a camminare più velocemente, il muscolo si è irrigidito, temporaneamente bloccato e contratto tanto da causare un'andatura a scatto e difficoltosa. Tuttavia non sono state registrate anomalie nell'attività elettrica muscolare ne durante lo sforzo ne negli attimi successivi. La stimolazione ripetuta a carico del nervo peroneale sinistro, non ha mostrato alcun decremento anomalo nel potenziale motorio evocato. La normale velocità di conduzione nervosa e le normali risposte elettriche alle stimolazioni muscolari ripetitive suggeriscono che il difetto non coinvolge il nervo periferico o la placca neuromuscolare. La

ridotta velocità di rilasciamento muscolare potrebbe non essere attribuita ad un difetto nelle proprietà elettriche del sarcolemma dal momento che, il complesso dei potenziali d'azione motori evocati mediante la stimolazione del nervo, erano normali, che l'inserzione dell'ago nel muscolo non causava l'insorgenza di attività elettrica spontanea e che l'attività elettrica muscolare durante il rilasciamento era assente. A fronte dello stato contrattuale l'esame elettromiografico non evidenziava gli elementi tipici delle miotonie, indirizzando il quadro miopatico verso le c.d. forme di pseudomiopatia (Sacchetto R., 2007).

2.6 Quadro istologico, immunoistochimico e biochimico del muscolo PMT.

L'esame istologico è stato eseguito su tre soggetti prelevando sempre il muscolo semimembranoso sia a riposo che dopo un periodo di stress muscolare organizzato in tre sedute al giorno della durata di 10 minuti ognuna ripetute per 10 giorni. I campioni sono stati prelevati secondo la tecnica descritta da Reynolds (Amann J.F., 1998); una parte è stata congelata mentre un'altra è stata sottoposta a sezione in criostato per le successive colorazioni morfologiche quali: tricromica di Gomori ed Ematossilina Eosina, per le reazioni istochimiche: Succinico deidrogenasi (*SDH*), combinato con la citocromo ossidasi (*COX*), miosina ATPase dopo preincubazione acida ed alcalina, PAS. I risultati istologici sia nelle colorazioni routinarie che nelle colorazioni più specificamente indirizzate a valutazioni di tipo metabolico, escludono forme di miopatia distrofica nonché stati di sofferenza mitocondriale. Le colorazioni morfologiche classiche (*Tricromia di Gomori, Ematossilina Eosina*) evidenziavano quadri di raddomiolisi caratterizzati dalla presenza di cellule giganti in via di

degenerazione (in modo più marcato nei 3 pazienti sottoposti a stress muscolare).

Le colorazioni con tecnica istochimica (*SDH, COX, SDH+COX, ATPasi-miosinica dopo preincubazione acida ed alcalina, PAS, Oil-red-O*) non hanno mostrato quadri istopatologici riconducibili a malattie metaboliche.

Le colorazioni di tipo immunoistochimico (*anticorpi anti l'isoforma della catena pesante della miosina di tipo neonatale – anti-neo MHC*) hanno mostrato la presenza di fibre di piccolo e medio calibro positive all'anticorpo anti-neo MHC nelle aree periferiche alle zone di raddomiolisi, testimoniando tendenza alla rigenerazione di nuove fibre muscolari a partire da cellule satelliti. I reperti istologici eseguiti sia su muscoli della spalla e della gropa sia sul tessuto nervoso prelevato da nervi periferici, dall'encefalo e midollo, hanno confermato l'assenza di anomalie strutturali. Gli studi biochimici sono stati eseguiti su frazioni di membrana

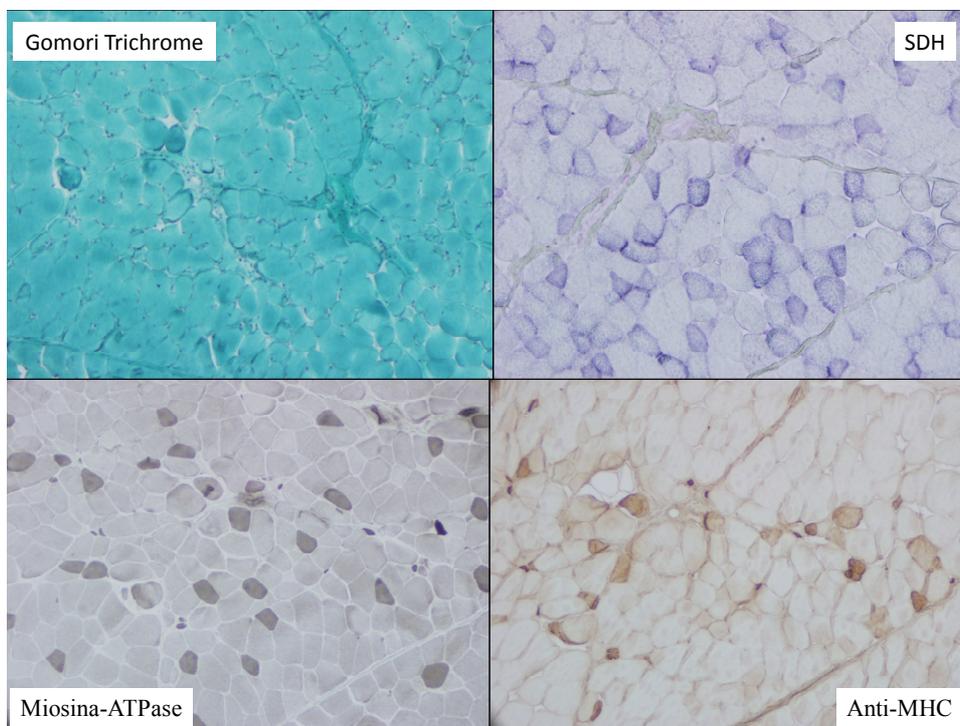


Figura 24: quadro istologico in diverse colorazioni di sezioni di muscolo con PMT.

microsomiale (TM) prelevati da campioni di muscolo semimembranoso di animali malati e da soggetti di controllo. La TM è dimostrato essere ricca di membrane del reticolo sarcoplasmatico dove tendono a concentrarsi i canali che intervengono nel meccanismo di rilascio e captazione del Ca^{2+} tra cui il SERCA1 (Margreth A., 1993; Sacchetto R., 1993). Mediante l'immunoblotting utilizzando anticorpi monoclonali specifici per l'isoforma SERCA1 (Affinity Bioreagents®), presente nelle fibre muscolari a contrazione rapida, si è dimostrato che la concentrazione di SERCA1 era notevolmente ridotto negli animali malati rispetto al gruppo di controllo, dato che viene confermato anche in letteratura (Karpati G., 1986; Danon M.J., 1988).

2.7 Diagnosi differenziale della PMT.

I disordini muscolari miotonici rappresentano un gruppo eterogeneo clinicamente simile, per questo motivo la diagnosi differenziale della pseudomiotonia è da elaborare prendendo in analisi i disturbi del movimento di natura ereditaria caratterizzati da deambulazione rigida e difficoltosa e da contrattura muscolare in presenza di uno stato sensoriale nella norma.

E' di recentissima pubblicazione una forma congenito ereditaria a carattere recessivo in bovini di razza Belgian Blue che si manifesta clinicamente come la PMT chiamata "*Congenital Muscular Dystonia*" o CMD I. Clinicamente i vitelli manifestano sin dalla nascita vari gradi di disfagia e incapacità a sollevarsi in stazione quadrupedale. Se stimolati a camminare, alcuni manifestano grave impedimento stancandosi rapidamente, altri invece esibiscono un movimento più sciolto. Tuttavia se incitati, si irrigidiscono e crollano a terra senza riuscire a flettere gli arti. Alla base della patogenesi è stata identificata una mutazione a carico del gene ATP2A1 (sostituzione di

C con T) mappato sul cromosoma 25 responsabile della sintesi del SERCA1 (Vandeputte S., 2006; Charlier C., 2007). Gli stessi ricercatori hanno descritto anche una variante della CMD, la "CMD II" anche questa caratterizzata da contrattura muscolare generalizzata ma molto più grave che porta l'animale a morte nell'arco di poche ore. Alla base della patogenesi è stata identificata una mutazione del gene SLC6A5 (sostituzione di T con C) mappato sul BTA 29 che codifica per il trasportatore della glicina (GlyT2) (Charlier C., 2007). In medicina umana le mutazioni del GlyT2 sono alla base di una sindrome con iperreflessia, un disordine neurologico caratterizzato da abnorme risposta agli stimoli, allontanamento esagerato dallo stimolo, contrazione rigida degli arti e rapida chiusura e apertura delle palpebre. Allo stato attuale sono state descritte fino a 7 mutazioni del SLC6A5 (Rees M.I., 2006).

La "abiotrofia della corteccia cerebellare" è un difetto ereditario dovuto a degenerazione selettiva delle cellule del Purkinje descritta nei bovini Angus, Hereford, e Charolais. Le manifestazioni cliniche insorgono poco dopo la nascita o solo al 2°-8° mese e consistono in accessi sporadici atassico-convulsivi o in rapida successione a tremori generalizzati; testa e coda sono mantenute sollevate con stazione ad arti divaricati. Tra una crisi e l'altra i vitelli presentano tremori, deambulazione rigida e faticosa e stazione ad arti divaricati (Rodostits O.M., 2007; Saperstein G., 2002; Stöber M., 2002).

Un'altra neuropatia degenerativa a carattere ereditario autosomica recessiva "Shaker syndrom", colpisce i vitelli Hereford provvisti di corna. I vitelli, subito dopo la nascita, manifestano afonia, un grave e diffuso tremore muscolare con andatura spastica e vacillante.

Nei bovini di razza Angus, Murray-grey e Galloway nonché nei rispettivi incroci, è descritta la " α mannosidasi", difetto ereditario autosomico-

recessivo dovuto alla carenza dell'enzima α mannosidasi lisosomiale acida. La patogenesi si basa sull'accumulo di oligosaccaridi contenenti mannosio e glucosamine nelle cellule nervose, linfonodi e milza. I sintomi clinici si instaurano generalmente all'età di 6 mesi e si manifestano con sviluppo stentato, stazione a base larga, atassia, tremore intenzionale del capo, cedimento degli arti posteriori, andatura a scatto ed incoordinata. Di solito, la malattia porta a morte entro 1 anno.

Un'altra patologia da considerare è la "*GM₁ gangliosidosi*" caratterizzata da accumulo lipidico neuronale riscontrata nei vitelli di razza Hereford. La base patogenetica è un'inibizione della produzione di β galattosidasi a carattere ereditario autosomico recessivo. I sintomi, che iniziano a 1-2 settimane di vita, sono rappresentati da masticazione e deglutizione lenta, riluttanza al movimento, deambulazione oscillante nel treno posteriore, debolezza generalizzata, testa mantenuta abbassata, rigidità della schiena. La sintomatologia si aggrava con cecità e dimagrimento progressivo fino al come e alla morte (Saperstein G., 2002; Stöber M., 2002; Rodostits O.M., 2007).

La "*mioclonia congenita*" o "*ipomielogenesi congenita*" è un difetto ereditario, autosomico recessivo monogenico, descritta nel 1985 nella razza Poll Hereford e negli incroci Hereford, successivamente è stata diagnosticata anche nella razza Jersey e South Devon. La patologia è dovuta alla mancanza della trasmissione inibitoria mediata dalla glicina. Non sono state dimostrate lesioni a carico del SNC. Dal punto di vista molecolare, la malattia è dovuta ad una sostituzione di una Citosina con una Adenina a livello del nucleotide 156 del gene codificante per la subunità $\alpha 1$ del recettore della glicina che comporta la formazione di un polipeptide senza capacità di legare la glicina. Clinicamente sono descritti miocloni intrauterino spontaneo, nascita prematura dei vitelli, movimenti

spasmodico mioclonici sia spontanei che in risposta a stimoli. I vitelli sono attenti ma non in grado di sollevarsi, rigidità muscolare e spasmo muscolare grave (Healy P.J., 2002).

Nei vitelli Aberdeen Angus, è stata descritta un'atassia familiare associata a convulsioni a carattere ereditario a dominanza incompleta. I segni clinici sono evidenti sin dalla nascita e si caratterizzano da movimenti abnormi e rigidi fino ad arrivare a convulsione ed opistotono. E' dovuto ad una degenerazione delle cellule del Purkinje della corteccia del cervelletto, la causa genetica non è stata ancora identificata (Saperstein G., 2002; Stöber M., 2002, Rodostits O.M., 2007).

Una patologia, finora descritta solo nei bovini di razza Charolais a carattere ereditario autosomica recessiva e monogenica è la "*carezza di miofosforilasi*" (Angelos S., 1995). E' una patologia causata dalla sostituzione di una Citosina con una Timina a livello del codone 489 del gene della miofosforilasi, gene non ancora mappato con precisione nel bovino. I segni clinici sono rappresentati da intolleranza all'esercizio, mialgia, mioglobinuria e raddomiolisi, caduta a terra se sottoposti a sforzo. L'aumento degli enzimi muscolari è un reperto costante. In umana è conosciuta come "*McArdle's disease*", nella quale si assiste all'accumulo di glicogeno tra le fibre muscolari prive di alcuna attività miofosforilasica (McArdle B., 1951).

In altre specie sono state descritte varie patologie muscolari a carattere mioclonico come la "*miotonia congenita*" delle capre di razza Angus e Tennessee (LeCouteur R.A., 2002; Rodostits O.M., 2007) dei cani di razza Chow Chow e Schnauzer nano (Shelton G.D., 2004) e del cavallo (Montagna P., 2000). Questa è una patologia ereditaria non progressiva, autosomica dominante, che si manifesta nelle prime settimane di vita con disturbi del moto, aumento del tempo necessario per rialzarsi dopo il decubito

imposto, rigidità muscolare in seguito a stimoli visivi e tattili, ipertrofia dei muscoli della coscia e della spalla. Sono assenti anomalie muscolari macroscopiche evidenti. La sintomatologia migliora con l'esercizio e non è aggravata dal freddo. All'esame ultrastrutturale, i mitocondri sono ingrossati. L'alterazione di base è una diminuzione della conduttanza di ioni Cl^- attraverso i tubuli T a causa di una mutazione nei canali ionici per gli ioni Cl^- .

Una patologia ereditaria caratterizzata da rigidità muscolare ma talvolta anche da collassamento muscolare è stata descritta nel Cavalier King



Figura 25: Episodio tetaniforme in una capra affetta da miotonia congenita.

Charles Spaniel; è denominata "*ipertonicità muscolare ereditaria*" (Shelton G.D., 2004).

La "*mioclonia congenita*" è una malattia neonatale sporadica del suino e si manifesta sotto forma di contrazioni cloniche bilaterali della muscolatura scheletrica. Le contrazioni cessano quando gli animali sono sdraiati o dormono, ma gli stimoli esterni, come rumori, sbalzi di temperatura o

stimolazioni improvvise provocano crisi convulsive gravi o improvvise. L'eziologia può essere imputata a "ipomielogenesi spinale", ad infezioni virali in utero e ad anomalie congenite del cervelletto (Bolin S.R., 1992).

2.8 Un modello animale per la medicina umana: PMT e malattia di Brody.

Nel confronto con la medicina umana la "Pseudomiopia congenita della Chianina" trova notevoli sovrapposizioni con la cosiddetta "Malattia di Brody" o "*Brody's disease*".

Brody descrisse un disordine dell'attività muscolare caratterizzato da crampi non dolenti associati alla mancanza di rilassamento muscolare in seguito ad esercizio. Dal punto di vista funzionale, Brody dimostrò mediante biopsia di un muscolo scheletrico che i suoi pazienti mostravano una ridotta attività di recupero del Ca^{2+} e dell'attività della pompa sarcoplasmatica Ca^{2+} ATPase. L'attenzione di Brody venne conseguentemente focalizzata su un difetto della pompa del Ca^{2+} come possibile causa della malattia (Brody M.D., 1969). Benders e coll dimostrarono che nei pazienti affetti dalla malattia di Brody, la concentrazione della proteina SERCA1 era normale ma l'attività enzimatica (V_{\max} del trasporto del Ca^{2+}) risultava ridotta del 50%, implicando un'alterata funzionalità del SERCA1 a fronte di una normale espressione genica. Come nei nostri animali, anche nell'uomo il quadro clinico è caratterizzato da rigidità muscolare non dolente, scatenata da un esercizio fisico vigoroso e/o improvviso con tendenza a peggiorare in presenza di freddo. Normalmente i muscoli colpiti sono quelli degli arti, della faccia e delle palpebre. La scomparsa dei sintomi avviene dopo pochi secondi di riposo. Questa patologia è distinta dal gruppo delle miotonie in quanto clinicamente il mancato rilassamento muscolare incrementa all'aumentare

dell'attività fisica invece di diminuire. Inoltre manca la miotonia percussoria (Benders A.A.G.M., 1994).

La malattia di Brody è attualmente considerata una rara malattia muscolare ereditaria legata ad un difetto di recupero del calcio ("reuptake") da parte del reticolo sarcoplasmatico nella fase di rilassamento muscolare. Il difetto è una mutazione del gene ATP2A1 mappato sul HSA 16 (16p12.1-16p11.2), codificante la pompa SERCA1 (*sarco-endoplasmic reticulum Ca-ATPase-1*).

Dal momento che l'attività del SERCA1 è alterata nei soggetti con malattia di Brody, ne deriva un rallentamento del ciclo contrazione-rilassamento che provoca la persistenza dello stato contrattuale del muscolo (MacLennan D.H., 2000).

Zhang e coll isolarono e caratterizzarono il gene ATP2A1 misurando 26 kd di lunghezza organizzati in 23 esoni mentre 994 aminoacidi vennero calcolati sul DNA complementare (cDNA).

Allo stato attuale sono state descritte 4 differenti mutazioni del ATP2A1. Una è stata localizzata a livello del sito di inizio dell'introne 3 (*splice donor site*) ed è responsabile della formazione di una proteina troncata (674 AA) priva del sito legante il Ca^{2+} . Altre due determinano un prematuro blocco della sequenza di stop troncando il SERCA1 e causando la perdita dei domini funzionali essenziali, quali il sito di fosforilazione e il sito per i nucleotidi regolatori. Questi studi hanno peraltro sollevato il quesito su come i soggetti affetti dalla malattia di Brody siano in grado di compensare la perdita della funzione del SERCA essenziale per il rilassamento muscolare (Zhang Y.,1995).

La quarta mutazione è stata identificata a livello del tratto 437-439 del cDNA del ATP2A1. (Odermatt A., 1996; Odermatt A., 1997)

Odermatt e coll (Odermatt A., 2000) hanno identificato l'unica mutazione missenso, finora descritta in pazienti affetti da malattia di Brody, di una T con C in posizione 2366 (Pro789 con Leu). Questa sostituzione è la responsabile della completa perdita della capacità legante il Ca^{2+} da parte del SERCA1.

Sono stati descritti casi di ereditarietà sia autosomica dominante sia recessiva tra i pazienti affetti da malattia di Brody (Karpati G., 1986; Danon M.J., 1988), tuttavia l'opinione più accreditata è quella a favore della modalità autosomica recessiva (MacLennan D.H., 1996). MacLennan e coll hanno cercato di giustificare il modello ereditario dominante in alcuni casi di Brody ritenendo non coinvolto il gene ATP2A1 ma bensì il gene PLN, responsabile della sintesi della fosfolambano. In particolare l'espressione di una forma mutata della PLN comporterebbe un'eccessiva inibizione del SERCA (MacLennan D.H., 2000). Questa ipotesi tuttavia non è stata confermata ma non esclude il possibile coinvolgimento di altri geni oltre all'ATP2A1. (Novelli A., 2004; MacLennan D.H., 2000).

Da un punto di vista laboratoristico, la malattia di Brody comporta una concentrazione di lattato sierico maggiore del normale anche se misurato in pazienti a riposo probabilmente a causa della continua attivazione della fosforilasi muscolare e quindi della glicolisi anaerobica. Sono spesso misurati incrementi della CK, più rari sono invece i fenomeni di mioglobinuria e rabdomiolisi. Morfologicamente il muscolo non presenta anomalie ne in sezione longitudinale ne trasversale se non fosse per un'atrofia delle fibre muscolari di tipo 2; a livello ultrastrutturale si possono rilevare aree centrali (*central cores*) a carico delle miofibrille. L'esame elettromiografico eseguito mediante inserzioni nei muscoli degli arti, rivela una normale attività di inserzione, assenza di attività spontanea a riposo e in contrazione. Se il muscolo viene volontariamente stimolato, produce un

normale pattern di interferenza con potenziali assolutamente nella norma senza mostrare alcun fenomeno miotonico dopo l'esercizio e durante il mancato rilassamento muscolare. La velocità di conduzione nervosa risulta normale come anche la risposta a stimoli elettrici sopramassimali. La normale velocità di conduzione nervosa e la risposta fisiologica mostrata all'elettromiografia, escludono patologie a carico dei nervi periferici o della giunzione mioneurale e sono assolutamente in sintonia con i reperti evidenziati mediante la genetica molecolare (Novelli A., 2004).

Il tentativo di creare un modello animale sperimentale della Brody ha prodotto una linea di topi mutati in modo selettivo per il gene ATP2A1 in modo da annullare la sintesi del SERCA1. La V_{max} del trasporto del Ca^{2+} a livello di reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico e diaframmatico era ridotta dell'80% rispetto a topi normali. A differenza dei soggetti umani colpiti da Brody, i topi morivano dopo poche ore dalla nascita per insufficienza diaframmatica. Questo dato suggerisce che la perdita dell'attività del SERCA1 non è compatibile con la vita nei topi, probabilmente nell'uomo, la presenza di processi compensatori del trasporto del Ca^{2+} permette la sopravvivenza (Pan Y., 2003).

Clinicamente simili sono le miotonie congenite dell'uomo ma che tuttavia si caratterizzano mediante quadri di miotonia vera all'EMG, tra queste ricordiamo le due forme più diffuse di miotonia congenita, la "*miotonia di Thomsen*" e la "*miotonia di Becker*". Sono disordini muscolari miotonici, non progressivi, a carattere ereditario, rispettivamente autosomica dominante e autosomica recessiva, non distrofici. La patogenesi è legata alla mutazione di alleli del gene che codifica per i canali di membrana del Cl^- delle cellule muscolari scheletriche, il CLCN1 mappato sul HSA 7. La funzione di questi canali di membrana è quella di regolare l'eccitabilità della fibrocellula muscolare (Thomsen E., 1948; Becker P.E., 1979).

La “*paramiotonia congenita di Von Eulenburg*” dell’uomo è inquadrata nel complesso delle “*adinamie-paramiotonie*” ed è dovuta ad una mutazione del gene SCN4A (HSA 17) che codifica per la subunità α dei canali del Na^+ delle fibrocellule muscolari scheletriche. Le differenze con le miotonie vere sono evidenti all’esame clinico ed EMG. Variazioni alleliche del SCN4A causano fenotipi sovrapponibili alla Von Eulenburg come la Paramiotonia Periodica Iperkaliemica e la Miotonia K-aggravante (Thrush D.C., 1972; Ricker K., 1986).

2.9 Lo studio del genotipo.

La casistica che è stata ammessa allo studio del genotipo ammonta a 12 soggetti clinicamente malati (7 maschi e 5 femmine, PMT) a cui sono stati aggiunti 16 soggetti con fenotipo non PMT ma consanguinei con i malati (7 maschi e 9 femmine, carriers); 134 individui clinicamente sani e non consanguinei con i precedenti sono stati utilizzati come controllo. I soggetti malati e i carriers erano accumulati dalla stesso progenitore.

L’estrazione del DNA dai campioni di sangue, sperma e muscolo è stata eseguita con la tecnica precedentemente descritta per la SAA, QIAamp® DNA mini kit. I microsatelliti mappati sul BTA 25 sono stati scelti nel set già disponibile mentre altri marcatori sono stati appositamente selezionati nella regione di interesse in base alla mappa genetica bovina disponibile online (*fine mapping*). Lo studio è stato completamente diverso da quello applicato alla SAA dal momento che la sintomatologia clinica della PMT si poteva sovrapporre a quella mostrata dai soggetti umani affetti dalla malattia di Brody. Abbiamo considerato la PMT una malattia ereditaria autosomica recessiva monogenica a penetranza completa, la cui base patogenetica fosse legata ad una mutazione del gene ATP2A1, mappato sul BTA 25. Questa associazione ha permesso di focalizzare l’attenzione

direttamente sul locus del gene ATP2A1 e di evitare la completa scansione dell'intero genoma dei soggetti in studio.

Nonostante la mappatura del genoma bovino sia ancora parziale, la regione veicolante il locus del gene ATP2A1 è già stata studiata nei dettagli, fornendo l'informazione necessaria per selezionare i markers limitrofi al gene bersaglio (*markers flanking*). L'identificazione dell'ATP2A1 è stata possibile consultando le banche dati online e comparando i dati forniti dal progetto di mappatura del genoma umano con quelli provenienti dallo studio del genoma bovino:

www.animalgenome.org/cattle/maps/RHMap3/,
www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/,
www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=518117&ordinalpos=6&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.

La procedura di amplificazione dei microsatelliti è avvenuta mediante PCR standard.

La disponibilità di un'unica grande famiglia ma poco informativa ha orientato la scelta verso l'analisi di linkage non parametrica con Software Merlin che ha confermato un linkage significativo ($Z_{\max}=3,18$) tra i markers



Figura 26: rappresentazione del gene ATP2A1 nel bovino, 17059 bp.

flanking e il BTA 25.

La fase successiva è stata quella dell'analisi di mutazione del gene candidato ATP2A1. Le reazioni di sequenziamento del gene ATP2A1 sono state eseguite sui prodotti della PCR amplificati da cDNA (2982 nucleotidi ORF, codificanti per 994 aminoacidi della proteina ATP2A1) ottenuto

dall'estrazione dell'mRNA da campioni di muscolo di animali sani e animali PMT. Il sequenziamento diretto è avvenuto utilizzando i primers usati per la PCR ed eseguito mediante sequenziatore ABI 3750 (Applied Biosystem®). L'analisi di 22 esoni e delle sequenze introniche di *splicing* del gene ATP2A1

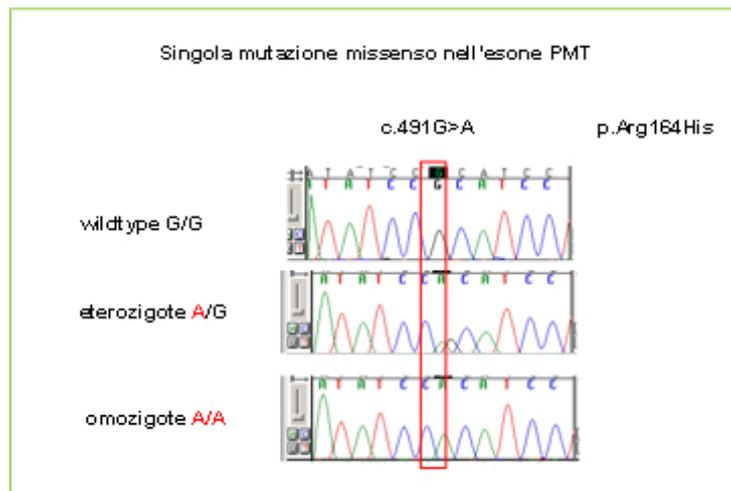


Figura 27: singola mutazione missenso nell'esone PMT

ha identificato una mutazione missenso puntiforme di tipo sostitutivo: una Adenina con una Guanina (*transizione*).

La mutazione della coppia di basi GG nell'esone PMT del gene ATP2A1

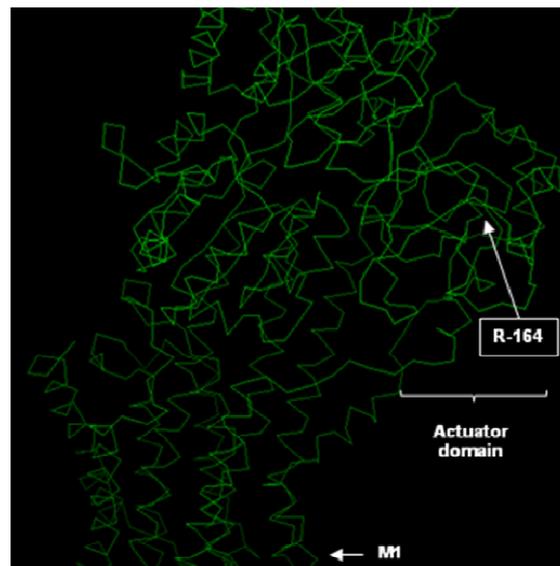


Figura 28: rappresentazione del SERCA1 mutato

causa la trascrizione di una sequenza nucleotidica nell'mRNA che si traduce nella sostituzione di un'Arginina con un'Istidina in posizione 164. La sostituzione di G con A nel cDNA dei soggetti malati ha trovato pieno

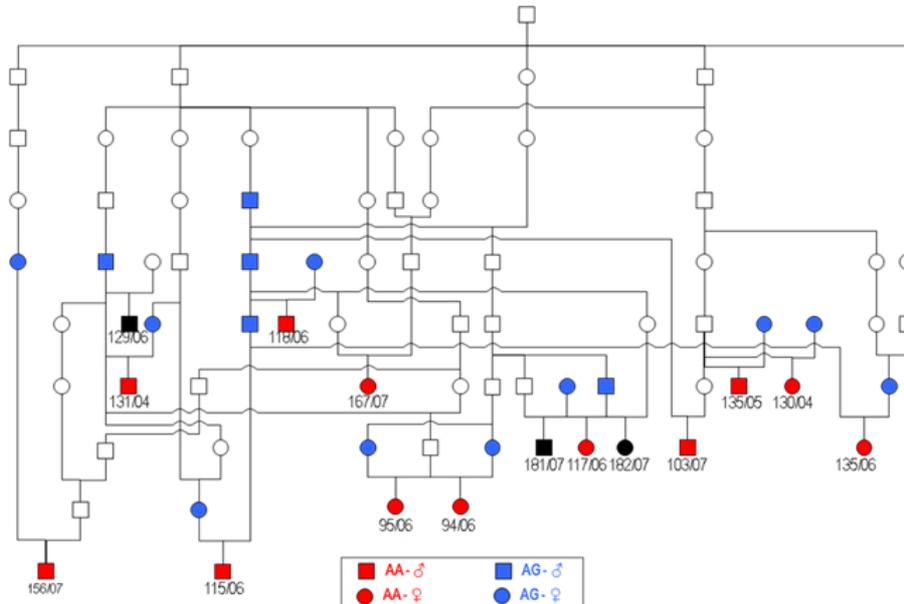


Figura 29: Genotipo dei soggetti PMT portatori e malati. La presenza del genotipo omozigote AA (Adenina) indica malattia a differenza dei carriers (A-Guanina).

riscontro nel pedigree.

2.10 Conclusioni.

La segnalazione continua e sistematica da parte di allevatori e veterinari ha permesso la descrizione e lo studio di una nuova patologia del sistema muscolo scheletrico del bovino di razza Chianina, la pseudomiopia congenita. Se lo studio clinico e autoptico hanno permesso di descrivere nei dettagli le peculiarità semiologiche, clinico patologiche, neurofisiologiche ed anatomopatologiche, la genetica molecolare ha confermato l'eziologia della PMT inquadrabile ora, tra le tare congenite a carattere ereditario monogeniche, autosomiche recessive a penetranza completa. La mutazione PMT ha il locus nel BTA 25. Questo primo risultato

ha reso disponibile un test genetico indiretto per la diagnosi di malattia e per l'identificazione dei carriers, fornendo lo strumento necessario per l'eradicazione della PMT dalla popolazione Chianina. Inoltre ha permesso di rispondere prontamente e definitivamente alle allarmate domande provenienti dal mondo allevatorio e veterinario su una patologia ad incidenza crescente. Un secondo aspetto riguarda invece la stretta correlazione tra la PMT e la malattia di Brody dell'uomo. Nonostante le mutazioni descritte nella pseudomiopia umana siano diverse dalla mutazione puntiforme missenso nel gene ATP2A1 identificata nel bovino, la PMT può essere inquadrata come un significativo modello animale da considerare per approfondire lo studio della Brody e sperimentare nuove soluzioni terapeutiche. Tuttavia da un punto di vista scientifico, lo studio della PMT necessita ancora ulteriori approfondimenti, in quanto l'apporto fornito dalla genetica molecolare ha solo parzialmente svelato la base genetica della malattia. Infatti, se la mutazione puntiforme di A-G sull'esone PMT è l'unica identificata, studi di morfofisiologia sulla proteina SERCA1 devono dimostrare che questa sostituzione aminoacidica nel dominio attuatore del SERCA1 sia la responsabile della ridotta attività enzimatica registrata.

Se il SERCA1 modificato dalla sostituzione, dimostrerà *in vitro* un corretto funzionamento sarà compito della genetica molecolare sequenziare tutti gli introni del gene ATP2A1 alla ricerca di eventuali altre mutazioni.

3 L'ASCITE CONGENITA DEL VITELLO ROMAGNOLO (PCS).

Fra le malformazioni che negli ultimi anni hanno arricchito la casistica clinica del Dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Veterinaria di Bologna, menzione particolare merita il c.d. "*vitello pancione*", un complesso malformativo di probabile natura ereditaria osservato negli ultimi anni in maniera ripetuta in vitelli di razza Romagnola (Gentile A., 2004).

Il merito della nota deriva non solo dallo scarso riscontro in letteratura di situazioni patologiche sovrapponibili, ma anche e soprattutto dalla preoccupazione che si tratti di una patologia ereditaria per la quale l'Associazione Nazionale Allevatori Bovini Italiani Carne (ANABIC) ha registrato, negli ultimi tempi, un aumento delle segnalazioni. Alla problematica legata all'aumento della casistica e quindi alla necessità di arginare una patologia congenita ormai diffusa all'interno della popolazione bovina romagnola, si associa la problematica legata al rischio di distocia a cui si assiste spesso in presenza di vitello pancione. La popolazione bovina romagnola, numericamente ridotta (16.000 capi nell'anno 2006; ANABIC), è fortemente esposta al rischio di sviluppare patologie congenite a carattere ereditario, favorito dalla diffusa pratica di selezione da anni in uso incline a sfruttare un numero molto limitato di tori. Purtroppo la frequenza dell'allele PCS nella popolazione romagnola è difficile da stimare in quanto, la segnalazione di casi è influenzata da fattori esterni che determinano una sottostima della reale casistica.

3.1 Caratteristiche anatomopatologiche della PCS.

All'esame esterno il "vitello pancione" mostra una dilatazione di vario grado dell'addome, la cui fluttuazione denuncia un abbondante raccolta liquida in cavità addominale, da cui denominazione di "pancione".

Seppure con qualche eccezione, lo splancnocranio si presenta accorciato e



Figura 30: vitello pancione con distensione addominale abnorme per notevole raccolta di liquido in cavità peritoneale.

schacciato (acondroplasia); è anche possibile, osservare protrusione della lingua e palatoschisi, quest'ultima con diverso grado di estensione. Talvolta le orecchie sono piccole e posizionate più ventralmente rispetto all'atteso.

Il tronco è normalmente sviluppato e così anche gli arti, anche se in alcuni casi è stato notato un ridotto sviluppo in lunghezza. Più costante, soprattutto a carico degli arti anteriori, la mancanza del dito accessorio medio.

Il primo aspetto caratterizzante il sezionamento autoptico, è un diffuso edema sottocutaneo, soprattutto a livello di regione ventrolaterale dell'addome; il colore dell'infiltrato interstiziale varia da giallastro a rosato, fino anche ad assumere aspetto di ematoma.

L'apertura dell'addome, confermando quanto sospettato dall'esame esterno, mostra la raccolta liquida, che può raggiungere quantità superiore ai dieci litri. Il carattere del liquido spazia da trasudato, di colore citrino e



Figura 31: Malformazioni splancocraniche tipiche della PCS, muso schiacciato e appiattito, brachignazia, allargamento della testa e orecchie piccole e mal posizionate.

pienamente trasparente, a trasudato modificato o anche essudato; in questi casi il colore è citrino, l'aspetto torbido e sono presenti straccetti o filamenti di fibrina più o meno adesi alle strutture addominali. In alcuni casi il versamento assume un carattere emorragico.

Un'altra lesione caratterizzante è l'epatomegalia, associata a irregolarità della superficie sierosa e ad indurimento sclerotico del parenchima. Il colore tende a schiarirsi ed assumere una tonalità giallo-ocra.

La presenza di cisti epatiche, anche multiple, di dimensioni variabili fino a quelle di una arancia, con contenuto da sieroso ad ematico, è un altro

frequente reperto. La sezione di taglio, oltre a confermare l'indurimento, si mostra solcata da sottili bande fibrose.

Non rara è la contemporanea presenza di versamenti a livello di cavità toracica e pericardica, con carattere sovrapponibile a quanto già illustrato

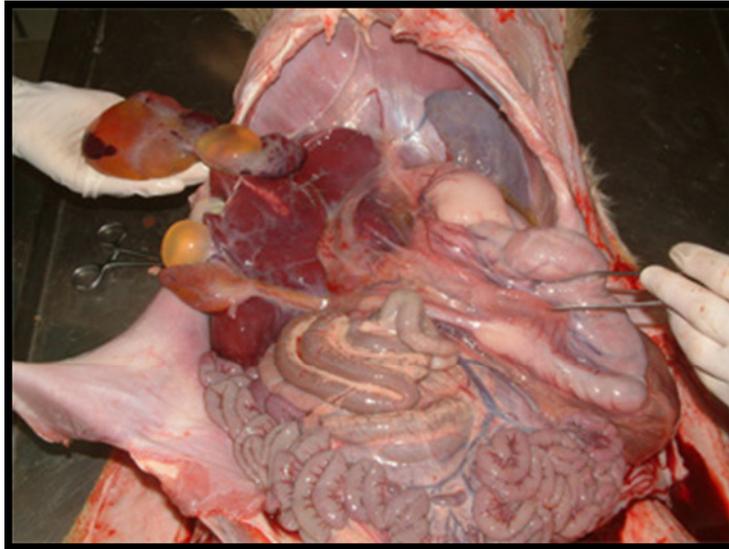


Figura 32: Particolare della cavità peritoneale con cisti epatiche

per la raccolta addominale.

Anomalie cardiache, rilevate in 10 soggetti, (persistenza del dotto di Botallo, persistenza del foro interatriale, comunicazione interventricolare)

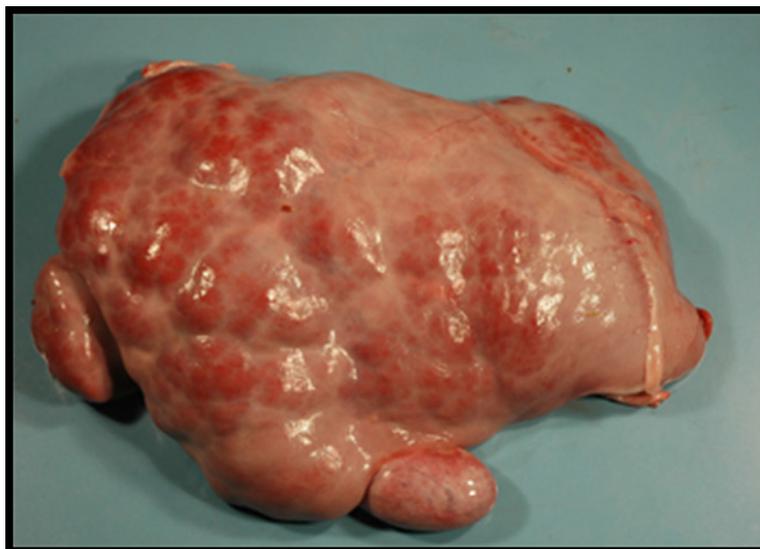


Figura 33: Particolare del fegato in un soggetto affetto da PCS, da notare l'aspetto bernocoluto e aggrinzito della superficie epatica.

e renali (rene policistico) possono essere rilevate frequentemente ma non sono reperti costanti (Gentile A.,2004) . Anche nel caso della PCS è stato di fondamentale importanza eseguire un accurato esame anatomopatologico al fine di escludere fenocopie.

L'esame virologico per BVD e la ricerca di *Neospora Caninum* è risultato negativo in tutti i soggetti descritti.

3.2 Quadro istologico.

I campioni prelevati dal tessuto epatico sono stati esaminati dopo

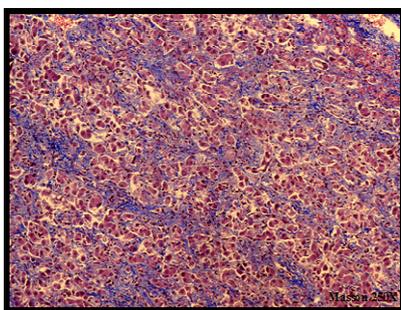
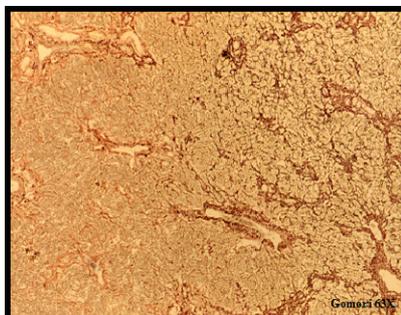
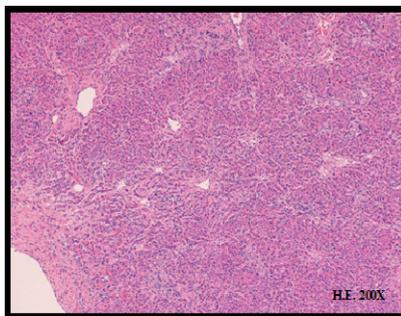


Figura 34: quadro istologico di sezioni di 5 μ di fegato colorate con Ematossilina Eosina, Gomori e Masson.

colorazione classica in Ematossilina eosina e colorazioni più specifiche quali Tricromica di Masson, Gomori e Rodanina.

Il referto istologico riporta una diffusa destrutturazione dell'architettura del parenchima epatico a causa di una fibrosi generalizzata, soprattutto nelle aree periportal ed attorno alle vene centrolobulari, tale da compromettere l'architettura lobulare. La fibrosi era particolarmente evidente nei preparati colorati con tecnica di Gomori e Masson.

La colorazione con Rodanina ha permesso di escludere una fibrosi indotta da accumulo di Rame.

In alcuni soggetti, è stata osservata una grave forma di fibrosi associata ad

inspessimento capsulare con atrofia e degenerazione degli epatociti.

3.3 Diagnosi differenziale della PCS.

In letteratura sono poche le segnalazioni di casi di ascite e fibrosi congenita. Le anomalie cranio facciali che colpiscono i vitelli pancioni ricordano la “*condrodisplasia*”, ampiamente descritta nei vitelli di razza Romagnola (Gentile, 2006).

In Giappone è stata descritta una tara ereditaria a carattere autosomico recessivo detta “*nanismo condrodisplastico del bovino*” (BCD) che richiama il



Figura 35: vitello romagnolo ricoverato presso il Dipartimento Clinico Veterinario affetto da condrodisplasia.

fenotipo tipico della condrodisplasia della Romagnola, arti corti e tozzi, anomalie delle articolazioni, ateliosi. Le ossa lunghe hanno un’insufficiente ossificazione endocondrale associata a irregolare disposizione dei condrociti, anomala formazione di matrice cartilaginea e parziale scomparsa della linea di accrescimento epifisale. Le ossa del tronco e del cranio non sono colpite in modo significativo. Il nanismo disarmonico

associato a deformità craniche e vertebrali è stato descritto in altre razze come Dexter (*Dexter Bulldog*), Aberdeen-Angus, Hereford e Shorthorn (Harper P., 1998; Saperstein G., 2002; Takeda H., 2002). Sono state identificate due mutazioni a carico dell'esone 11 e dell'esone 1 a carico del



Figura 36: vitello Bulldog di razza Dexter, evidenti le anomalie scheletriche.

gene ACAN, responsabile della sintesi di proteoglicani durante lo sviluppo embrionale (Cavanagh J.A., 2007).

Una sindrome che si accosta alla PCS è riportata nei testi come "*fibrosi idiopatica del vitello*". Si osserva talvolta in vitelli morti per insufficienza epatica pochi giorni o poche settimane dopo la nascita, raramente anche in feti abortiti e in vitelli macellati. Il fegato risulta ingrossato a superficie liscia e giallastra, è alquanto indurito. Il quadro istologico è dominato da una diffusa fibrosi con moderata infiltrazione dei mononucleati e limitata proliferazione dei dotti biliari. Le cause non sono ancora note (Marcato P.S., 2002).

Alla base dello sviluppo di fibrosi epatica associata a destrutturazione delle vie biliari, è implicata un'incompleta formazione della lamina duttale o un'anomala formazione dei dotti biliari durante lo sviluppo embrionale. Dal

punto di vista embrionale, il fegato si sviluppa dalla regione dell'endoderma intestinale anteriore come un grande rigonfiamento ventrale o diverticolo epatico primitivo. E' diviso in due parti, una epatica da cui deriverà il parenchima del fegato e una parte cistica che formerà la cistifellea. Le cellule endodermiche della parte epatica proliferano intensamente formando strati di cellule che si differenziano negli epatociti. Nello stesso tempo, il diverticolo epatico si sviluppa a formare ramificazioni le cui porzioni terminali sono piccoli spazi compresi tra le cellule del parenchima. Queste sono in comunicazione con ramificazioni più grandi e formano il sistema duttale biliare (Latshaw W.K., 1987; Noden D.M., 1991). Cisti intraepatiche congenite possono manifestarsi in numero e dimensioni variabili, semplici, multiple o conglomerate a parete connettivale sottile, a contenuto chiaro sieroso. Il meccanismo di formazione di queste cisti viene imputato al fatto che una parte dei cordoni che, canalizzandosi, daranno luogo ai dotti; per anomalia di sviluppo rimane impervia o che una parte di un dotto rimanga isolata o, infine, che un dotto rimanga strozzato da un'eccedenza di sviluppo di tessuto connettivo. In tutti i casi, la parte di canale che rimane esclusa dal sistema duttale si dilata per il ristagno di secreto. Quando le cisti sono molto diffuse nell'organo, la malformazione viene indicata come fegato cistico congenito che è voluminoso e costellato di cisti intercomunicanti (Latshaw W.K., 1987; Marcato P.S., 2002).

Yoshikawa e coll hanno descritto un caso di fibrosi epatica congenita in un vitello di razza Holstein-Friesian. L'esame necroscopico ha evidenziato versamento addominale, epatomegalia e superficie epatica irregolare e granulosa. All'esame istologico si evidenziava fibrosi diffusa del fegato e una rete di tessuto connettivo che si diramava all'interno del parenchima tra aree periportali e vene centrali. L'accumulo di tessuto connettivo è stato documentato anche mediante l'immunoistochimica. Oltre alle lesioni

al fegato erano presenti formazioni cistiche renali e polmonari (Yoshikawa H., 2002).

Rilievo anatomopatologico caratterizzante la PCS è il versamento addominale, talvolta estremamente consistente.

L'ascite è definita come raccolta di liquido libero prevalentemente o esclusivamente sieroso nella cavità peritoneale. Di solito si intende la raccolta in peritoneo di trasudato (Prot tot: <15 g/L e <3000 globuli bianchi) o trasudato modificato (prot tot: 25/60 g/L, globuli bianchi). Quando un trasudato si accumula esclusivamente in peritoneo e mancano fenomeni di edema periferico o di trasudazione pleurica, la raccolta inizia essenzialmente da variazioni della pressione idrostatica portale, per aumento della resistenza della circolazione sanguigna intraepatica o postepatica. L'aumento della pressione portale epatica determina solitamente la raccolta di un trasudato modificato dovuto a stilloidismo di linfa dai linfatici del fegato. Ipertensione portale si manifesta in genere, in presenza di cirrosi, fibrosi, shunt arterovenosi congeniti o acquisiti e tumori epatici (Marcato P.S., 2002; Cullen J.M., 2007).

Nel cane è descritta una "*ipoplasia della vena porta*", un'anomalia vascolare congenita caratterizzata da vene portali intra ed extraepatiche molto piccole con conseguente scarsa perfusione epatica e aumento della pressione portale. Gli animali colpiti hanno un fegato piccolo, vene portali di ridotte dimensioni o assenti, proliferazione delle arteriole linfatiche ed atrofia degli epatociti (Cullen J.M., 2007).

Sono relativamente recenti le pubblicazioni di una sindrome caratterizzata da dilatazione congenita dei dotti biliari intraepatici segmentali del cane, molto simile alla "*malattia di Caroli*" dell'uomo. I cuccioli presentano cisti dei dotti biliari intra ed extraepatici e malattia policistica renale. Le lesioni cistiche risultano essere in continuità con i dotti biliari. L'esame istologico

evidenza iperplasia dei dotti biliari ectasici e displasia con fibrosi portale epatica. Il contenuto delle cisti è viscoso ma limpido, spesso associato a materiale calcificato (Görlinger S., 2003; Last R.D., 2006).

Una forma di fibrosi epatica e dilatazione abnorme dei dotti biliari con formazione di cisti solitarie o multiple a carattere autosomico recessivo è stata diagnosticata in puledri di razza Swiss Freiberger. Il fegato appare aumentato di dimensioni, di consistenza dura e stridente alla sezione, le cisti biliari sono di forma e dimensione irregolari. La fibrosi epatica è diffusa ma diventa marcata a livello degli spazi porto-portali, i dotti biliari sono dilatati. Non sono state descritte anomalie a carico degli altri organi (Haechler S., 2000).

3.4 Patologie correlate alla PCS in medicina umana.

La prevalenza di malattia epatica cistica in medicina umana è approssimativamente del 5% in tutto il mondo anche se l'incidenza sembra aumentare negli anni. Tra le patologie congenite ereditarie che si caratterizzano con lesioni cistiche al fegato è descritta la "*malattia da cisti epatica solitaria*" che è descritta con una prevalenza del 2,5%. Usualmente le cisti si localizzano al lobo destro e sono multiloculate, tuttavia raramente sono sintomatiche. Quando presenti, i sintomi clinici sono rappresentati da vomito, nausea, e disappetenza. Raramente si associano a torsione, superinfezione o ostruzione biliare. Si riformano in seguito ad aspirazione percutanea. Le donne sono maggiormente colpite (Crawford J.M., 2005).

La "*malattia epatica policistica*" (PCLD) è un disordine ereditario a carattere autosomico dominante che può essere associato a malattia policistica renale nel 50% dei soggetti (Berrebi G., 1982; Davila S., 2004). Entrambi i lobi sono colpiti dando origine ad epatomegalia, anche se spesso la patologia è asintomatica. La causa è imputata alla mutazione del gene

PRKCSH, mappato sul HSA 19, responsabile della sintesi della epatocistina. Allo stato attuale sono conosciute 6 varianti alleliche (Reynolds D.H., 2000; Drenth J.P.H., 2003). Inoltre è stata descritta una variante fenotipiche dovuta alla mutazione del gene SEC63 mappato sul HSA 6, responsabile della sintesi di una proteina integrale di membrana del RE con attività di trasporto (Davila S., 2004).

Una dilatazione biliare intraepatica congenita è stata diagnosticata da Caroli nel 1958 da cui il nome di "*Caroli's disease*", anomalia caratterizzata da dilatazione policistica congenita, segmentale e sacculare dei dotti biliari intraepatici senza essere associata ad altre malformazioni epatiche. Clinicamente si accompagna a ipertensione portale, colangite ed epatomegalia. La malattia di Caroli è stata recentemente inclusa all'interno della "*malattia policistica renale*" (Adeva M., 2006).

Malformazioni a cluster dei dotti biliari interlobulari più periferici che appaiono dilatati sono invece caratteristiche del "*complesso di Von Meyenburg*", patologia ad andamento sporadico (Desmet V.J., 2005).

Tra le lesioni congenite cistiche del fegato si manifestano con la più alta incidenza le dilatazioni cistiche dei dotti biliari extraepatici che consistono nelle "*cisti del coledoco*" secondarie a malformazioni embrionali precoci a carico della giunzione duttale pancreatico-biliare (Fujii H., 2002; Dhumeaux D., 2005). Associata alla dilatazione cistica del coledoco e a cisti epatiche congenite è possibile diagnosticare anche atresia del duodeno (Mali V., 2007).

Un'anomalia di sviluppo del fegato che si presenta con epatosplenomegalia, ipertensione portale e colangite è la "*fibrosi epatica congenita*". Caratteristica è la formazione di ampie ed irregolari bande di tessuto fibroso contenenti cisti multiple derivate dai dotti biliari terminali anomali, localizzate principalmente negli spazi portalì così da dar luogo a

compressione dei vasi e quindi ipertensione portale. Può essere associato a malattia policistica renale. E' una malattia ereditaria, autosomica recessiva che si manifesta prevalentemente nell'infanzia (Hunter M., 1966).

I disordini congeniti della glicosilazione (*CDG*) sono un gruppo eterogeneo di tare ereditarie a carattere autosomico recessivo causate dal difetto nella sintesi o processazione dei glicani o delle glicoproteine. La mutazione del gene che codifica per l'isomerasi del mannosio fosfato (*MPI*) causa una sindrome (*CDG1B*) caratterizzata da diarrea secretoria, enterocolite cistica, linfangectasia, fibrosi epatica congenita e carenza di fattori della coagulazione (Pelletier V.A., 1986). Un'altra sindrome dovuta ad alterata glicosilazione (*CDG1H*) per mutazione del gene *ALG8*, si manifesta con ascite ed edemi generalizzati dovuti ad enteropatia proteino-disperdente ed epatomegalia (Chantret I., 2003).

Schollen (Schollen E., 2004) ha descritto una forma particolarmente grave di "*CDG1H*" in 3 pazienti affetti da letargia, diarrea, ascite massiva fino a morte prematura in età infantile. Due soggetti mostravano anche segni clinici prenatali come ritardo nello sviluppo intrauterino e ridotti movimenti fetali. Uno dei tre pazienti aveva testa malformata, fontanelle larghe, anomala posizione delle orecchie, collo corto, criptorchidismo, cisti biliari intra ed extraepatiche, colestasi, ascite progressiva e microcisti renali.

La forma epatica classica della "*sindrome da deficienza dello stoccaggio del glicogeno*" (glicogenosi IV, GSD IV) è responsabile di una progressiva e letale cirrosi epatica del bambino. La patogenesi si basa su una mutazione del gene *GBE1* locato sul cromosoma 3 a cui consegue un deficit dell'enzima *amilotransglucosidasi* che interviene nella sintesi del glicogeno. I sintomi si manifestano dopo 18 mesi di vita con epato e splenomegalia e cirrosi epatica (Andersen D.H., 1956; Brown B.I., 1966). All'ipertensione portale, si

associa ascite, insufficienza epatica che può portare a morte dopo 5 anni di vita (Bao Y., 1996). Una variante non progressiva della forma epatica classica è stata riportata in letteratura da Greene (Greene H.L., 1988); i soggetti colpiti hanno epatomegalia e fibrosi epatica che si è mostrata non progressiva verso la cirrosi nell'arco di 3 anni.

Esmer (Esmer C., 2001) descrisse in 2 pazienti, la contemporanea presenza di malattia fibrocistica epatica e polidattilia. Uno dei pazienti mostrava, inoltre, ritardo mentale ed insufficienza renale cronica. La patologia sembra ereditaria a carattere autosomico recessivo. Caratteristiche cliniche ed anatomopatologiche simili sono descritte nel complesso delle "*sindromi di Bardet-Biedl*", un gruppo eterogeneo di disordini ereditari autosomico recessivi, nei quali alla polidattilia ed alla fibrosi epatica si associano anche anomalie oftalmiche, neurologiche, genitali, cardiache e metaboliche. Il linkage per le Bardet Biedl sono 9, distribuiti su tutto il genoma umano (Klein D., 1978; Green J.S., 1989; Elbedaur K., 1994; Islek I., 1996).

Tra le malformazioni della "*sindrome di Meckel*" è tipico rinvenire displasia cistica renale associata a polidattilia, fibrosi epatica cistica ed encefalocele (Pettersen J.C., 1984). Le lesioni epatiche sono dovute a fibrosi portale, obliterazione dei vasi portali, dilatazione e proliferazione dei vasi duttali biliari. La morte avviene spesso in età perinatale. La sindrome di Meckel è ereditaria a carattere autosomico recessivo dovuta alla mutazione del gene MKS1 mappato sul HSA 17 che codifica per una componente dei corpi basali dell'apparato flagellare.

E' stata descritta da Verloes e coll (Verloes A., 1989) una sindrome, chiamata "*Coach syndrome*", in un 2 fratelli con genitori consanguinei. La sindrome è caratterizzata da atassia ad insorgenza precoce, ipoplasia o aplasia del verme del cervelletto, fibrosi epatica, ritardo mentale moderato

e scheletro sottile. La biopsia del fegato evidenzia fibrosi settale e formazione di pseudolobuli.

3.5 Lo studio del genotipo dei vitelli “pancioni”.

Lo studio del genotipo PCS si è avvalso di una casistica rappresentata da 23 soggetti affetti da PCS (9 maschi e 14 femmine) e 5 carriers consanguinei (1 maschio e 4 femmine). A questi, sono stati aggiunti 27 soggetti di sesso femmina, di razza Romagnola e di età avanzata (media di 8 anni) non

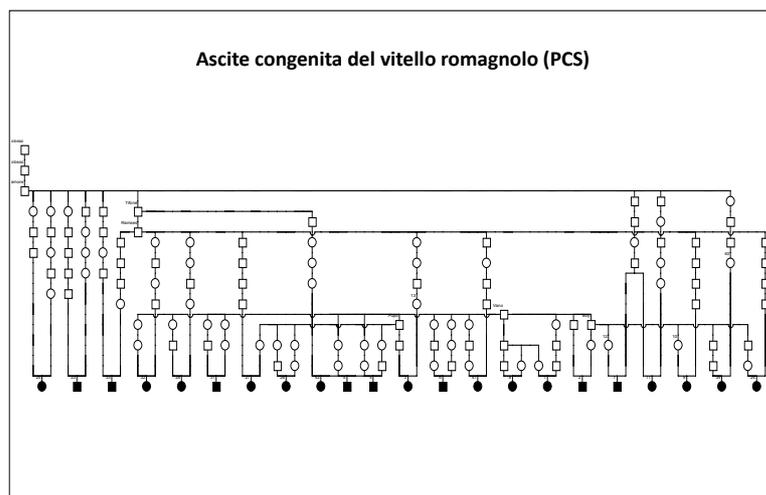


Figura 37: pedigree dei vitelli PCS. Un'unica grande famiglia accumulata dallo stesso progenitore.

correlati con i precedenti e considerati soggetti sani non portatori, in base alla completa assenza di vitelli malformati nella loro discendenza.

I soggetti ammessi allo studio non sono stati raggruppati in famiglie come nel caso della SAA, in quanto la scarsità di informazioni (impossibilità a definire le differenti generazioni) e di materiale biologico appartenente ai genitori dei malati, era tale da impedire la formazione di un pedigree dettagliato e affidabile. Dal momento che tutti i soggetti PCS ammessi allo studio erano accumulati dallo stesso ancestore e, verosimilmente, dalla

condivisione dello stesso allele mutato, sono stati raggruppati in un'unica grande famiglia.

Il DNA dei soggetti ammessi allo studio è stato estratto da tessuto cutaneo, sperma e sangue conservati a -20°C mediante la stessa tecnica utilizzata per la SAA e la PMT.

| N labor | N° clinica | Materiale | Fenotipo | Madre | Padre |
|---------|--------------|-----------|----------|-----------------|-----------------|
| PCS1 | 71/04 | Tessuto | PCS | IT 039666669151 | IT 039666670434 |
| PCS2 | 137/04 | Tessuto | PCS | IT 020FO032C012 | DENARO |
| PCS3 | 72/05 | Tessuto | PCS | BO 112992 | IT 039666669182 |
| PCS4 | 124/06 | Tessuto | PCS | IT 014RA121B078 | IT 039666674403 |
| PCS5 | 131/06 | Tessuto | PCS | IT 039666667987 | IT 039666674403 |
| PCS6 | 134/06 | Tessuto | PCS | IT 039990001591 | IT 039990005204 |
| PCS7 | 145/06 | Tessuto | PCS | IT 039333340354 | IT 039666669857 |
| PCS8 | 122/04 | Tessuto | PCS | | |
| PCS9 | 91/04 | Sangue | PCS | IT 037100006546 | NADIR |
| PCS11 | 63/06 | Sangue | PCS | FO123540 | IT 039666669857 |
| PCS23 | 7bis/03 | DNA | PCS | | |
| PCS24 | 8/03 | DNA | PCS | | |
| PCS25 | 13/03 | DNA | PCS | | |
| PCS26 | 15/03 | DNA | PCS | | |
| PCS27 | 17/03 | DNA | PCS | | |
| PCS28 | 27/03 | DNA | PCS | | |
| PCS31 | 33/03 | DNA | PCS | | |
| PCS32 | 35/03 | DNA | PCS | | |
| PCS33 | 45/04 | DNA | PCS | | |
| PCS34 | 47/03 | DNA | PCS | | |
| PCS39 | 70/07 | Tessuto | PCS | | |
| PCS41 | 45/07 | Sangue | PCS | | |
| PCS42 | 35/07 | Tessuto | PCS | | |
| PCS10 | madre 91/04 | Sangue | carrier | | |
| PCS12 | madre 145/06 | Sangue | carrier | | |
| PCS13 | madre 72/05 | Sangue | carrier | | |
| PCS22 | BOY | Sperma | carrier | | |
| PCS40 | madre 70/07 | Sangue | carrier | | |

Tabella 6: soggetti PCS e carriers ammessi allo studio. La mancanza di completezza nella progenie dei soggetti è legata alla scarsa o dubbia veridicità dei dati registrati negli anni.

L'approccio di studio del genotipo dei soggetti affetti da PCS è stato la "Homozygosity mapping" sull'intero genoma (*Whole genome scan*), in quanto il modello di ereditarietà che è stata avanzata in base alle caratteristiche della malattia, alla casistica segnalata ed al pedigree dei

soggetti osservati, è stato quello autosomico recessivo monogenico a penetranza completa.

Il set di microsatelliti-markers utilizzato è stato quello già testato sui vitelli SAA. Tuttavia il numero di microsatelliti si è ridotto a 230 markers

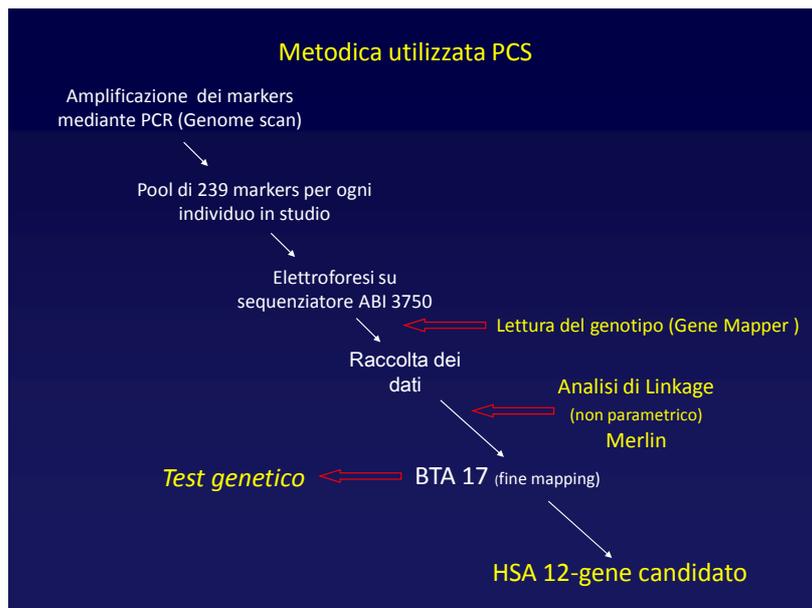


Figura 38: schematizzazione dello studio del genotipo e dell'analisi di linkage nella PCS.

informativi. L'amplificazione dei markers è stata eseguita mediante PCR multiple standard seguendo lo stesso protocollo usato per la SAA.

Il modello statistico adottato nello studio della PCS si è avvalso dell'analisi di associazione eseguito dal software SAS (SAS® Genetics). La sintesi e l'analisi dei dati forniti dalla genotipizzazione sono state la PROC ALLELE e la PROC CASE-CONTROL. In particolare, la PROC ALLELE è stata utilizzata per calcolare la frequenza e la varianza allelica e genotipica quindi testare la proprietà di alleli a co-segregare nella popolazione (*LD*) inoltre, per stimare il grado informativo di un marker e valutare la significatività della frequenza di un genotipo. L'analisi mediante PROC CASE-CONTROL invece, ha permesso di confrontare la frequenza allelica e quella genotipica dei

soggetti malati con quella degli animali controllo all'interno della popolazione (*analisi di associazione*), nello stesso tempo ha consentito di eseguire una correlazione tra le frequenze alleliche dei membri dello stesso gruppo. Se lo studio si è basato sul carattere peculiare di "omozigotità" dell'aplotipo dei malati, il grado di "eterozigotità" o "polimorfismo" di ogni singolo marker è stato invece il controllo di riferimento per stimare la validità dell'associazione.

Con "eterozigotità" si intende la qualità o quanto è informativo un marker in una determinata popolazione; se un microsatellite si manifesta con due soli alleli in tutta la popolazione testata, è evidente che il suo grado di

| Markers | case | | control | | Case-Control Test | | SAS | | |
|------------------|------|----|---------|------|-------------------|------|----------|---------|---------|
| | n | n | allele | het | allele | het | Genotype | Allele | Trend |
| | | | n | n | n | n | | | |
| BTA17_I | 20 | 30 | 3 | 0.40 | 3 | 0.50 | 0.71798 | 0.54956 | 0.59555 |
| BTA17_E | 23 | 31 | 6 | 0.78 | 6 | 0.74 | 0.08548 | 0.07899 | 0.04167 |
| BTA17_B1 | 23 | 31 | 4 | 0.22 | 3 | 0.23 | 0.12755 | 0.13225 | 0.07525 |
| BTA17_B2 | 23 | 30 | 4 | 0.13 | 3 | 0.50 | 0.02029 | 0.01388 | 0.00905 |
| BTA17_A | 23 | 31 | 2 | 0.22 | 6 | 0.52 | 0.00265 | 0.00001 | 0.00065 |
| BTA17_D | 23 | 31 | 5 | 0.43 | 6 | 0.81 | 0.00055 | 0.00001 | 0.00008 |
| BTA17_B3 | 23 | 31 | 2 | 0.13 | 6 | 0.65 | 0.0013 | 0.00164 | 0.00102 |
| BTA17_H | 22 | 31 | 3 | 0.23 | 8 | 0.81 | 0.00155 | 0 | 0.00001 |
| BTA17_C | 23 | 31 | 1 | 0.00 | 4 | 0.74 | 0 | 0 | 0 |
| BTA17_MS4 | 23 | 31 | 1 | 0.00 | 4 | 0.55 | 0.00001 | 0 | 0 |
| BTA17_MS3 | 21 | 30 | 2 | 0.10 | 15 | 0.97 | 0.00509 | 0 | . |
| BTA17_MS1 | 22 | 31 | 2 | 0.36 | 13 | 0.87 | 0.02115 | 0.00003 | 0.00153 |
| BTA17_MS2 | 23 | 31 | 3 | 0.22 | 7 | 0.58 | 0.12897 | 0.0105 | 0.05917 |
| BTA17_T | 22 | 31 | 1 | 0.00 | 3 | 0.13 | 0.03532 | 0.00822 | 0.03532 |
| BTA17_B4 | 22 | 31 | 4 | 0.41 | 6 | 0.35 | 0.32563 | 0.06248 | 0.19508 |
| BTA17_H1 | 22 | 31 | 4 | 0.55 | 7 | 0.81 | 0.2212 | 0.02186 | 0.08342 |

Figura 39: studio PROC ALLELE e PROC CASE/CONTROL con SAS.

"eterozigotità" è molto basso, sarà quindi frequente trovare genotipi omozigoti per quel marker. Viceversa se un marker mostra più alleli nella popolazione, la comparsa di un genotipo omozigote sarà maggiormente significativo.

L'analisi di associazione eseguita con Software SAS® sui dati raccolti mediante genotipizzazione dei soggetti malati e sani, ha evidenziato un'alta probabilità di associazione tra fenotipo malato PCS e una serie di markers localizzati in una regione del BTA17.

Quello che sorprende ad una prima analisi è che il gene candidato PCS è localizzato in una regione molto ristretta, delimitata dai markers PCS3 e BTA17MS distanziati tra loro di 0,7 cM e che corrisponde ad un tratto di circa 24.000 bp se visualizzata sul corrispondente HSA 12 (*fine mapping*). In umana, questo tratto veicola più di 70 geni tra i quali abbiamo individuato un possibile locus candidato.

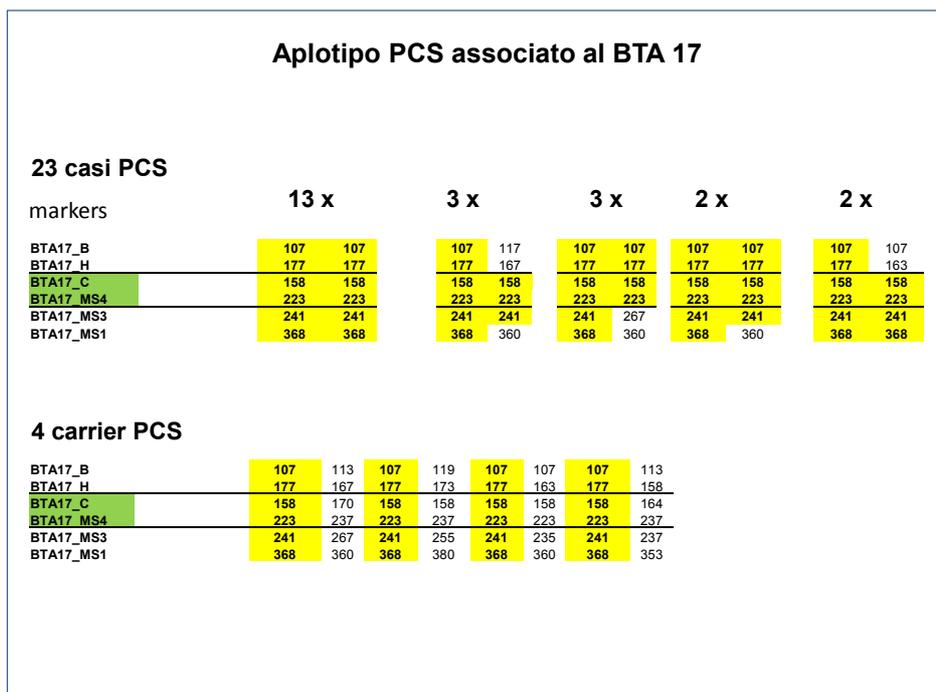


Figura 40: visualizzazione dell'aplotipo PCS, omozigote nei malati e eterozigote nei carriers.

La ridotta estensione del tratto bersaglio potrebbe essere il segno che la mutazione sia avvenuta molte generazioni prima del nostro progenitore. Questa supposizione è stata avanzata considerando che fenomeni di

crossing over avvengono con elevata frequenza nel tempo, per cui è possibile ritenere che la ricombinazione genica all'interno della popolazione abbia selezionato e delimitato la mutazione in questo breve tratto genomico.

3.6 Conclusioni.

L'alta incidenza di vitelli "pancioni" nella popolazione romagnola è stata evidente sin dai primi anni di studio, ne era testimonianza l'elevato numero di casi pervenuti presso il DCV di Bologna e le segnalazioni continue dei molti allevamenti della zona estesa tra Romagna ed Emilia. Anche in questo caso, fattore di cruciale importanza per intraprendere lo studio di questa nuova patologia è stata la campagna di informazione e sensibilizzazione dei veterinari liberi professionisti, degli allevatori e delle associazioni di razza. La gravità della malattia, la sua alta incidenza e la consapevolezza di un elevato grado di consanguineità nella popolazione romagnola hanno sicuramente agevolato e accelerato i tempi per identificare l'eziologia della PCS. Sia il reperimento sistematico di tutti i casi sospetti segnalati, che ha permesso la descrizione del fenotipo della malattia sia l'attenta e scrupolosa raccolta dei dati e del materiale, che ha consentito la costruzione del pedigree, hanno posto le basi per il successivo studio genetico.

L'analisi del genoma ha quindi confermato il carattere ereditario monogenico a carattere autosomico recessivo a penetranza completa della PCS. La variazione allelica PCS è mappata sul BTA17. Ha fornito inoltre un test indiretto di diagnosi il cui valore nella lotta all'eradicazione della malattia è altissimo in quanto verrà applicato a soggetti altamente consanguinei in una popolazione ridotta di numero. Come per la SAA, anche in questo caso è necessario continuare a reperire materiale per

riuscire a restringere ulteriormente la regione bersaglio e identificare con maggior precisione un gene candidato.

4 DISCUSSIONE.

I programmi di miglioramento genetico nel bovino hanno contribuito significativamente ad incrementare le produzioni negli ultimi 50 anni. La selezione inoltre ha interessato recentemente anche la fertilità e la longevità. La maggior parte di questi tratti risulta sotto il controllo di diversi geni e sono influenzati dall'ambiente di allevamento. La selezione avviene quindi valutando il fenotipo senza conoscere il numero preciso di geni coinvolti nell'espressione del tratto d'interesse. Questa condizione può causare l'utilizzo di riproduttori molto qualificati per quello che riguarda le caratteristiche fenotipiche produttive, senza considerare l'eventualità che siano riproduttori portatori di alleli mutati.

I progressi avvenuti nella genetica molecolare permettono attualmente di identificare le mutazioni che causano la comparsa di anomalie alla nascita o nella vita adulta o di trovare marcatori genetici strettamente concatenati al locus "malattia". Utilizzando queste tecniche è possibile controllare le anomalie genetiche. La segnalazione di diversi casi sia di PMT che di PCS avvenuta negli ultimi anni, esemplifica come anche una malattia ad incidenza rara possa nell'arco di breve tempo, diffondersi all'interno di una razza e diventare una problematica per gli allevatori. Questa considerazione trova maggior riscontro allorché all'interno dei migliori tori utilizzati come riproduttori si abbia una tara genetica. Nel caso della SAA, la mutazione veicolata nel genoma dei soggetti portatori è riuscita a permanere nella popolazione per anni.

La segnalazione di malattie da parte degli allevatori e dei liberi professionisti è un capitolo cruciale per lo sviluppo di test diagnostici basati

sulla genetica molecolare. La possibilità di raccogliere campioni biologici e di osservare le caratteristiche fenotipiche degli animali affetti, è la condizione necessaria per iniziare uno studio di tipo molecolare. Occorre quindi sensibilizzare in primis i medici veterinari, le associazioni di razza e gli allevatori per la sistematica segnalazione di casi sospetto. La necessità di continuare a reperire casistica è legata al fatto che ancora non è stata raggiunta la diagnosi genetica di malattia. La validità dei test indiretti si avvicina al 99% e questo garantisce l'ausilio all'eradicazione delle malattie descritte, tuttavia da un punto di vista strettamente scientifico, solo l'identificazione delle singole mutazioni e la loro espressione patogenetica concludono lo studio molecolare delle malattie ereditarie.

4.1 Ringraziamenti.

L'intero studio del genoma bovino eseguito per tutte le malattie descritte in questa tesi, è stato compiuto presso l'Istituto di genetica animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Berna (Svizzera). Un particolare ringraziamento è dedicato al Dott. Cord Drögemüller, la cui guida ha permesso di sviluppare questo studio. L'impegno e la dedizione che ha speso per questo progetto nonché l'aiuto che mi ha riservato nel periodo di permanenza in Istituto, sottolineano la professionalità di questo ricercatore e confermano l'alto livello scientifico dell'Istituto di Genetica di Berna. Ringrazio inoltre il Prof. Tosso Leeb, direttore dello stesso Istituto svizzero, per aver appoggiato con entusiasmo l'intero progetto.

Un valido supporto è stato fornito dalla Facoltà di Veterinaria e di Medicina umana di Padova, nella persona della Dott.ssa Stefania Testoni e dei suoi collaboratori che oltre a fornire casistica hanno collaborato attivamente nello studio della PMT mediante l'analisi ultrastrutturale e di immunohistochimica del muscolo.

Le indagini elettromiografiche sono state possibili grazie al contributo fornito dal Dott. Liguori R. e dall'equipe del Centro di Scienze Neurologiche dell'Università di Bologna.

5 BIBLIOGRAFIA.

Abbas A.K. Disorders associated with Defects in Structural Proteins – Genetic Disorders. In: *Robbins and Cotran - Pathological Basis of Disease*; Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. Saunders Elsevier (2007).

Abecasis G.S., Cherny S.S., Cookson W.O., Cardon L.R. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees”. *Nature Genet* 30, 97-101 (2002).

Adeva M., El-Youssef M., Rossetti S., Kamath P.S., Kubly V., Consugar M.B., Milliner D.M., King B.F., Torres V.E., Harris P.C. “Clinical and molecular characterization defines a broadened spectrum of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)”. *Medicine* 85, 1-21 (2006).

Alvarez F., Bernard O., Brunelle F., Hadchouel M., Leblanc A., Odievre M., Alagille D. Congenital hepatic fibrosis in children. *J Pediatr* 99, 370–375 (1981).

Amann J.F. Tecniche di Biopsia del Muscolo Scheletrico. In: *Tecnica Chirurgica*; Bojrab M.J., Ellison G.W., Slocum B. UTET (1998).

ANABIC: www.anabic.it

ANARB: www.anarb.it

Andersen D.H. Familial cirrhosis of the liver with storage of abnormal glycogen. *Lab. Invest.* 5, 11-20 (1956).

Andrews A.H. Congenital Condition. In: *Bovine Medicine*; Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd M., Eddy R.G. Blackwell Publishing (2004).

Angelos S., Valberg S.J., Smith B.P., McQuarrie P.S., Shanske S., Tsujino S., DiMauro S. e Cardinet G.H. Myophosphorylase deficiency associated with rhabdomyolysis and exercise intolerance in 6 related Charolais cattle. *Muscle and Nerve* 18, 736-740 (1995).

Bao Y., Kishnani P., Wu J.Y., Chen Y.T. Hepatic and neuromuscular forms of glycogen storage disease type IV caused by mutations in the same glycogen-branching enzyme gene. *J. Clin. Invest.* 97, 941-948 (1996).

Beals, R. K.; Hecht, F. Congenital contractural arachnodactyly: a heritable disorder of connective tissue. *J. Bone Joint Surg.* 53A, 987-993 (1971).

Becker, P. E. Heterozygote manifestation in recessive generalized myotonia. *Hum. Genet.* 46, 325-329 (1979).

Beighton P., De Paepe A., Steinmann B., Tsipouras P., Wenstrup R.J. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche 1997. *Am. J. Med. Genet.* 77, 31-37 (1998).

Belleh S., Zhou G., Wang M., Der Kaloustian V.M., Pagon R.A., Godfrey M. Two novel fibrillin-2 mutations in congenital contractural arachnodactyly. *Am J Med Genet.* May 1; 92(1), 7-12 (2000).

Benders A.A.G.M., Veerkamp J.H., Oosterhof A., Jongen P.J.H., Bindels R.J.M., Smith L.M.E., Busch H.F.M., Wevers R.A. Ca²⁺ homeostasis in Brody's disease: a study in skeletal muscle and cultured muscle cells and the effects of dantrolene and verapamil. *J. Clin. Invest.* 94, 741-748 (1994).

Berrebi, G.; Erickson, R. P.; Marks, B. W. Autosomal dominant polycystic liver disease: a second family. *Clin. Genet.* 21, 342-347 (1982).

Besser, T.E., Potter, K.A., Bryan, G.M., Knowlen, G.G. An Animal Model of the Marfan Syndrome, *Am J. Med Genet* 37, 159-165 (1990).

Bilstrom J.A., Valbery S.J., Bernoco D., Mickelson J.R. Genetic test for myophosphorylase deficiency in Charolais cattle, *Am J Vet Res* 59 pp. 267–270 (1998).

Bolin S.R. Mioclonia Congenita Virale – Malattie Virali. In: *Malattie del Suino*; Leman A.D., Straw B.E., Mengelin W.L., D’allaire S., Taylor D. Piccin (1992).

Borghetti P., Martini M. F. Artropatie da anomalie dello sviluppo osteocartilagineo - Sistema Locomotore: articolazioni. In: *Patologia Sistematica Veterinaria*; Marcato P.S. Edagricole (2002).

Breitschwerdt E.B., Kornegay J.N., Wheeler S.J. et al. Episodic weakness associated with exertional lactic acidosis and myopathy in Old English Sheepdog littermates. *J Am Vet Med Assoc* 201, 731–736 (1992).

Brem G., Wanke R., Hondele J., Dahme E. Zum Auftreten des Arachnomelie-Syndroms in der Brown-Swiss x Braunvieh Population. *Bayerns. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 97, 393-397 (1984).

Brown B.I., Brown D.H. Lack of an alpha-1,4-glucan: alpha-1,4-glucan 6-glycosyl transferase in a case of type IV glycogenosis. *Proc. Nat. Acad. Sci* 56, 725-729 (1966).

Camino E., Antoniotti S. L’attività muscolare volontaria ed involontaria – Il muscolo striato. In *Fisiologia degli Animali Domestici con Elementi di Etologia*; Aguggini G., Beghelli V., Giulio L. F. UTET (2004).

Caroli J., Soupault J., Kossakowski J., Plocker L., Paradowska M. La dilatation polykystique congenitale des voies biliaires intrahepatiques. *Sem. Hop. Paris* 34, 488-495 (1958).

Cavanagh J.A., Tammen I., Windsor P.A., Bateman J.F., Savarirayan R., Nicholas F.W., Raadsma H.W. Bulldog Dwarfism in Dexter Cattle is caused by mutation in ACAN. *Mamm. Genome*, 18, 808-814 (2007).

Chantret I., Dancourt J., Dupre T., Delenda C., Bucher S., Vuillaumier-Barrot S., de Baulny H.O., Peletan C., Danos O., Seta N., Durand G., Oriol R., Codogno P., Moore S.E.H. A deficiency in dolichyl-P-glucose:Glc-1-Man-9-GlcNAc2-PP-dolichyl alpha-3-glucosyltransferase defines a new subtype of congenital disorders of glycosylation. *J. Biol. Chem.* 278, 9962-9971 (2003).

Charlier C., Xavier H., Wouter C., Tamma N., Tevel V., Kvasz A., and coll. Power of Genome-Wide Association Studies in Cattle: Congenital Muscular Dystony is an Oligogenic Disorder Caused by Mutations in Serca1 and GlyT2. *Proc of Plant & Animal Genomes XV Conference*. January, 534 (2007).

Crawford J.M. Intrahepatic Biliary Tract Disease – Liver and Biliary Tract. In: *Robbins and Cotran Pathological Basis of Disease*; Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. Elsevier Saunders (2005).

Cullen J.M. Developmental Anomalies and Incidental Findings – Liver, Biliary System and Exocrine Pancreas. In: *Pathological Basis of Veterinary Disease*; McGavin M.D., Zachary J.F. Mosby Elsevier (2007).

Danon MJ, Karpati G, Charuk J, Holland P. Sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase deficiency with probable autosomal dominant inheritance. *Neurology* 38, 812-815 (1988).

Davila S., Furu L., Gharavi A.G., Tian X., Onoe T., Qian Q., Li A., Cai Y., Kamath P.S., King B.F., Azurmendi P.J., Tahvanainen P., and 9 others : Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nature Genet.* 36, 575-576 (2004).

Desmet V.J. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme ductal plate malformation. *Hepatology* 16, 1069–1083 (1992).

Desmet V.J. Cystic diseases of the liver. From Embryology to Malformations. *Gastroenterol Clin Biol.* 29 (8-9), 858-60 (2005).

Dhumeaux D. Congenital cystic diseases of the intra and extrahepatic bile ducts. *Gastroenterol Clin Biol.* 29 (8-9), 878-82 (2005).

Dirksen G. Neo - e malformazioni alla colonna, al tronco e agli arti. In: *Medicina Interna e Chirurgia del Bovino*; Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M. Point Veterinaire Italie (2002).

Douglas C., Frosch M. P., De Girolami U. Disease of Skeletal Muscle – Peripheral Nerve and Skeletal Muscle. In: *Robbins and Cotran Pathological Basis of Disease*; Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. Elsevier Saunders (2005).

Drenth J.P.H., te Morsche R.H.M., Smink R., Bonifacino J.S., Jansen J.B.M.J. Germline mutations in PRKCSH are associated with autosomal dominant polycystic liver disease. *Nature Genetics* 33, 345-348 (2003)

Elbedour, K.; Zucker, N.; Zalstein, E.; Barki, Y.; Carmi, R. Cardiac abnormalities in the Bardet-Biedl syndrome: echocardiographic studies of 22 patients. *Am. J. Med. Genet.* 52, 164-169 (1994).

Esmer C., Alvarez-Mendoza A, Lieberman E., Del Castillo V, Ridaura-Sanz C. Liver fibrocystic disease and polydactyly: proposal of a new syndrome. *Am J Med Genet.* 101 (1), 12-6 (2001).

Fujii H, Matsumoto Y., Suda K. Congenital Anomalies of the Pancreas and the Extrahepatic Bile Ducts. In: *Diseases of the Pancreas Current Surgical Therapy*; Beger H. G., Matsuno S., Cameron J.L. Springer Berlin Heidelberg, 9-17 (2002).

Gentile A., Diana A., Testoni S., Cipone M. Complex Vertebral Malformation (CVM) in a Holstein Calf: Clinical and Radiological (X-Ray and CT-Scan) Aspects. *Proc 23rd World Buiatrics Congress, Québec (2004).*

Gentile A., Militerno G., Marcato P.S. Congenital Paunch Calf Syndrome in Romagnola cattle. *Proc 23rd World Buiatrics Congress, Quebec (2004).*

Gentile A., Testoni S. Inherited Disorders of Cattle: A Selected Review. *Slov. Vet. Res.* 43 (1), 17-29 (2006).

Görlinger S, Rothuizen J, Bunch S, Van den Ingh T.S. Congenital dilatation of the bile ducts (Caroli's disease) in young dogs. *J Vet Intern Med.* 17(1), 28-32 (2003).

Gray, J. R.; Davies, S. J. Marfan syndrome. *J. Med. Genet.* 33, 403-408 (1996).

Green J.S., Parfrey P.S., Harnett J.D., Farid N.R., Cramer B.C., Johnson G., Heath O., McManamon P.J., O'Leary E., Pryse-Phillips W. The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *New Eng. J. Med.* 321, 1002-1009 (1989).

Greene H.L., Brown B.I., McClenathan D.T., Agostini R.M.Jr., Taylor S.R. A new variant of type IV glycogenosis: deficiency of branching enzyme activity without apparent progressive liver disease. *Hepatology* 8, 302-306 (1988).

Haechler S., Van Den Ingh T.S.G.A.M., Rogivue C., Ehrensperger F., Welle M. Congenital Hepatic Fibrosis and Cystic Bile Duct Formation in Swiss Freiburger Horses. *Vet Pathology* 37, 669-671 (2000).

Harper P., Latter M.R., Nicholas F.W., Cook R.W., Gill P.A. Chondrodysplasia in Australian Dexter cattle. *Aust Vet J Vol* 76, March (1998).

Healy PJ., Pierce K.D., Dennis J.A., Windsor P.A., Schiffield P.R. Bovine myoclonus: Model of human hyperekplexia (Startle disease). In : *Movement Disorders*. Vol. 17, No4, 743-747 (2002).

Hunter M., Akdamar K., Sparks R.D., Reed R.J., Brown C.L.Jr. : Congenital dilatation of the intrahepatic bile ducts. *Am. J. Med.* 40, 188-194 (1966).

Irwin I., Brody M.D. Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. *N. Engl. J. Med.* 281, 187-192 (1969).

Islek I., Kucukoduk S., Erkan D., Bernay F., Kalayci A.G., Gork S., Kandemir B., Gurses N. Bardet-Biedl syndrome: delayed diagnosis in a child with Hirschsprung disease. *Clin. Dysmorph.* 5, 271-273 (1996).

Karpati G, Charuk J, Carpenter S, Jablecki C, Holland P. Myopathy caused by a deficiency of Ca²⁺ - adenosine triphosphatase in sarcoplasmic reticulum (Brody disease). *Ann Neurol* 20, 38-49 (1986).

Klein, D. Personal Communication. Geneva, Switzerland (1978).

König H., Gaillard C., Chavaz J., Hunziker F., Tontis A. Prüfung von Schweizer Braunvieh-Bullen auf das vererbte Syndrom der Arachnomelie und Arthrogrypose (SAA) durch Untersuchung der Nachkommen im Fetalstadium. *Tierärztl. Umschau* 42, 692-697 (1987).

Last R.D., Hill J.M., Roach M., Kaldenberg T. Congenital dilatation of the large and segmental intrahepatic bile ducts (Caroli's disease) in two Golden retriever littermates. *J S Afr Vet Assoc.* 77(4), 210-214 (2006).

Latshaw W.K. Fegato – Apparato Digerente. In: *Lo sviluppo degli Animali Domestici*; Latshaw W.K. Casa Editrice Ambrosiana (1987).

LeCouteur R.A. Muscle Spasms and Myoclonus – Musculoskeletal Abnormalities. In: *Large Animal Internal Medicine*; Smith B.P. Mosby (2002).

Lehmann-Horn F., Gengel A., Ricker K., Rüdell R. The Periodic Paralysis and Paramyotonia Congenita – Altered Excitability of the Muscle Cell Membrane. In *Myology*; Engel A.G., Armstrong C. F. McGraw-Hill Inc (1994).

Leipold H.W., Hiraga T., Dennis S.M. Congenital Defects of the Bovine Musculoskeletal System and Joints. In: *Congenital Abnormalities, The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*; Dennis S.M. Saunders Elseviers (1993).

Leipold H.W., Steffen D. Syndrome of Arachnomelia and Arthrogryposis (SAA) in Brown Swiss Calves. *Brown Swiss Bulletin* (1989).

MacLennan D.H. Ca²⁺ signaling and muscle disease. *Eur. J. Biochem.* 267, 5291-5297 (2000).

MacLennan D.H., Loke J. Disease associated with ion channel and ion transporter defects: Brody disease and Brody syndrome. In: *Molecular and structural basis of skeletal muscle diseases*; Karpati G. ISN Neuropath Press, 103-105 (2002).

MacLennan D.H., Green N.M. Structural biology: Pumping ions. *Nature* 405, 633-634 (2000).

Mali V, Wagener S, Sharif K, Millar AJ. Foregut atresias and bile duct anomalies: rare, infrequent or common? *Pediatr Surg Int* 23, 889–895 (2007).

Marcato P. S. Anomalie ed Alterazioni Regressive Congenite e/o Ereditarie del Sistema Nervoso Centrale. In: *Patologia Sistematica Veterinaria*; Marcato P. S. Edagricole (2002).

Marcato P. S. Malformazioni congenite – Fegato e Pancreas. In *Patologia Sistematica Veterinaria*; Marcato P. S. Edagricole (2002).

Marcato P. S. Miopatie congenite ed ereditarie - Sistema Locomotore: muscoli. *Patologia Sistematica Veterinaria*; Marcato P.S. Edagricole (2002).

Marfan, M.A.B. Un cas de deformation congenitale des quatre membres, plus prononcee aux extremités, caracterisee par l'allongement des os avec un certain degre d'amincissement. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop.* 13, 220-226 (1896).

Margreth A, Damiani E, Tobaldin G. **Ratio of dihydropyridine to ryanodine receptors in mammalian and frog twitch muscles in relation to the mechanical hypothesis of excitation-contraction coupling.** *Biochem Biophys Res Commun.* 197(3), 1303-1311 (1993).

McArdle, B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin. Sci.* 10, 13-33 (1951).

McGeady T.A., Quinn P.J., Fitzpatrick E.S., Ryan M.T. Genetic, Chromosomal and Environmental Factors which Adversely affect Pre-natal Development". In: *Veterinary Embryology*; McGeady T.A., Quinn P.J., Fitzpatrick E.S., Ryan M.T. Blackwell Publishing (2006).

McGavin M.D., Valentine B.A. Inherited or Congenital Myopathies – Muscle. In *Thomson's Special Veterinary Pathology*; Carlton W.W., Zachary J.F. Mosby (2001).

Mizuguchi T., Matsumoto N. Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *J Hum Genet.* 52, 1–12 (2007).

Montagna P, Liguori R, Monari L, Strong PN, Riva R, Di Stasi V, Gandini G, Cipone M. Equine muscular dystrophy with myotonia. *Clin Neurophysiol.* 112(2), 294-299 (2001).

Morton N.E. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet.* 7(3), 277-318 (1955).

Mudd S.H., Skovby F., Levy H.L., Pettigrew K.D., Wilcken B., Pyeritz R.E., Andria G., Boers G.H.J, Bromberg I.L., Cerone R., Fowler B., Grobe H., Schmidt H., Schweitzer L. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37, 1-31 (1985).

Nicholas F.W. Basic Genetics. In: *Introduction to Veterinary Genetics*; Nicholas F.W. Blackwell Publishing (2003).

Noden D.M., DeLahunta A. Fegato e Cistifellea – Apparato Digerente. In *Embriologia degli Animali Domestici.* EDI-ERMES (1991).

Noden D.M., DeLahunta A. Cause di Malformazioni Congenite. In *Embriologia degli Animali Domestici.* EDI-ERMES (1991).

Novelli A., Valente E.M., Bernardini L., Ceccarini C., Sinibaldi L., Caputo V., Cavalli P., Dallapiccola B. Autosomal dominant Brody disease cosegregates with a chromosomal (2;7) (p11.2;p12.1) translocation in an Italian family. *Eur J Hum Genet.* 12(7), 579-583 (2004).

Odermatt A., Barton K., Khanna V.K., Mathieu J., Escolar D., Kuntzer T., Karpati G., MacLennan D.H. The mutation of pro(789) to leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+) ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum. Genet.* 106, 482-491 (2000).

Odermatt A., Taschner P.E.M., Khanna V.K., Busch H.F.M., Karpati G., Jablecki C.K., Breuning M.H., MacLennan D.H. Mutations in the gene encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nature Genetics* 14, 191-194 (1996).

Odermatt A., Taschner P.E.M., Scherer S.W., Beatty B., Khanna V.K., Cornblath D.R., Chaudhry V., Yee W-C., Schrank B., Karpati G., Breuning M.H., Knoers N., MacLennan D.H. Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics* 45, 541-553 (1997).

OMIA: omia.angis.org.au/adv_search.shtml

OMIM: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim

Pan Y., Zvaritch E., Tupling A.R., Rice W.J., De Leon S., Rudnicki M., McKerlie C., Banwell B.L., MacLennan D.H. Targeted Disruption of the ATP2A1 Gene Encoding the Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase Isoform 1 (SERCA1) Impairs Diaphragm Function and Is Lethal in Neonatal Mice. *J. Biol. Chem.* 278(15), 13367-13375 (2003)

Parsons J.C., Hoffman Y., Potter K.A., Besser T.E. Normal Elastin Content of Aorta in Bovine Marfan Syndrome. *Experimental and Molecular Pathology* 57, 145-152 (1992).

Pelletier V.A., Galeano N., Brochu P., Morin C.L., Weber A.M., Roy C.C. Secretory diarrhea with protein-losing enteropathy, enterocolitis cystica superficialis, intestinal lymphangiectasia and congenital hepatic fibrosis: a new syndrome. *J. Pediat.* 108, 61-65 (1986).

Pessier, A.P., Potter, K.A. Ocular pathology in bovine marfans syndrome with demonstration of altered fibrillin immunoreactivity in explanted ciliary body cells. *Laboratory Investigation* 75, 87-95 (1996).

Pettersen J. C., Opitz J. M., Reynolds J. F. Gross anatomical studies of a newborn infant with the Meckel syndrome. *Am J Med Genetics* 18(4), 649-659 (1994).

Potter, K.A., Besser, T.E. Cardiovascular lesions in bovine Marfan syndrome. *Veterinary Pathology* 31, 501-509 (1994).

Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D. Inherited Defects of the Musculoskeletal System. In *Veterinary Medicine*; Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D. Saunders Elsevier (2007).

Rees M.I., Harvey K., Pearce B.R., Chung S.-K., Duguid I.C., Thomas P., Beatty S., Graham G.E., Armstrong L., Shiang R., Abbott K.J., Zuberi S.M., Stephenson J.B.P., Owen M.J., Tijssen M.A.J., Van den Maagdenberg A.M.J.M., Smart T.G., Supplisson S., Harvey R.J. Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nature Genet.* 38, 801-806 (2006).

Reick G.W., Schade W. Die Arachnomelie (Spinnengliedrigkeit), ein neues erbliches letales Mißbildungssyndrom des Rindes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* (1975).

Reinhardt D.P., Ono R.N., Sakai L.Y. Calcium stabilizes fibrillin-1 against proteolytic degradation. *J. Biol Chem.* 272, 1231-1236 (1997).

Reynolds D.M., Falk C.T., Li A., King B. F., Kamath P.S., Huston J., Shub C., Iglesias D.M., Martin R.S., Pirson Y., Torres V.E., Somlo S. Identification of a locus for autosomal dominant polycystic liver disease, on chromosome 19p13.2-13.1. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1598-1604 (2000).

Ricker, K.; Rudel, R.; Lehmann-Horn, F.; Kuther, G. Muscle stiffness and electrical activity in paramyotonia congenita. *Muscle Nerve* 9, 299-305 (1986).

Rossi AE and Dirkens RT. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle and Nerve* 33, 715-731 (2006).

Rüdel R., Lehmann-Horn F., Ricker K. The Non Dystrophic Myotonias – Altered Excitability of the Muscle Cell Membrane. In *Myology*; Engel A.G., Armstrong C.F. McGraw-Hill Inc (1994).

Sacchetto R., Testoni S., Gentile A., Mascarello F. SERCA1 activity in the Congenital Pseudo-myotonia of Chianina cattle. *IV Meeting Istituto Interuniversitario di Miologia (IIM)* (2007).

Sacchetto R, Volpe P, Damiani E, Margreth A. Postnatal development of rabbit fast-twitch skeletal muscle: accumulation, isoform transition and fibre distribution of calsequestrin. *J Muscle Res Cell Motil.* 14(6), 646-653 (1993).

Saperstein G. Congenital Abnormalities of the Internal Organs and Body Cavities. In: *Congenital Abnormalities The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*; S.M. Dennis. Elsevier (1993).

Saperstein G. Congenital Defects and Hereditary Disorders in Ruminants. In *Large Animal Internal Medicine*; B.P. Smith. Mosby (2002).

Schollen E., Frank C.G., Keldermans L., Reyntjens R., Grubenmann C.E., Clayton P.T., Winchester B.G., Smeitink J., Wevers R.A., Aebi M., Hennet T., Matthijs G. Clinical and molecular features of three patients with congenital disorders of glycosylation type 1h (CDG-1h) (ALG8 deficiency). *J. Med. Genet.* 41, 550-556 (2004).

Shelton G.D. Muscle pain, cramps and hypertonicity. In *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice Neuromuscular Diseases II*; Shelton G.D. Vol 34(6), 1483-1496 (2004).

Singleton, A.C., Mitchell, A.L., Byers, P.H., Potter, K.A., Pace, J.M. Bovine model of Marfan syndrome results from an amino acid change (c.3598G > A, p.E1200K) in a calcium-binding epidermal growth factor-like domain of fibrillin-1. *Hum Mutat* 25, 348-352 (2005).

Stöber M. Disturbi del Movimento di Natura Ereditaria. In *Medicina Interna e Chirurgia del Bovino*; Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M. Point Veterinaire Italie (2002).

Stover S.M. Arthrogryposis – Disease of the Bones, Joints and Connective Tissues. In: *Large Animal Internal Medicine*; Smith B.P. Mosby (2002).

Takeda H., Takami M., Oguni T., Tsuji T., Yoneda K. Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10549-10554 (2002).

Tekin M., Cengiz F.B., Ayberkin E., Kendirli T., Fitoz S., Tutar E., Ciftci E., Conba A. Familial neonatal Marfan syndrome due to parental mosaicism of a missense mutation in the FBN1 gene. *Am. J. Med. Genet.* 143, 875-880 (2007).

Testoni S., Diana A., Olzi E., Gentile A. Short Spine Lethal in due vitelli di razza Frisona. *Atti Soc. It. Buiatria* 37, 273-281 (2005).

Testoni S., Gentile A. Arachnomelia in four Italian Brown calves. *Vet. Rec.* 155, 372 (2004).

Testoni S., Liguori R., Mascarello F., Pietra M., Gentile A. Congenital Pseudo-myotonia in Chianina cattle. *IV Meeting Istituto Interuniversitario di Miologia.* (2007).

Testoni S., Mazzariol S., Gentile A. Perosomus elumbis in four calves. *Atti XIII Congresso Internazionale della Federazione Mediterranea Sanità e Produzione dei Ruminanti* (2005).

Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, et al. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res.* 16, 97–105 (2006).

Thomasen, E. Myotonia, Thomsen's disease. Paramyotonia and dystrophia myotonica. *Op. Ex Domo Biol. Hered. Hum. U. Hafniensis* 17, 11-251 (1948).

Thrush D.C., Morris C.J., Salmon M.V. Paramyotonia congenita: a clinical, histochemical and pathological study. *Brain* 95, 537-552 (1972).

Urreizti, R.; Asteggiano, C.; Bermudez, M.; Cordoba, A.; Szlago, M.; Grosso, C.; de Kremer, R. D.; Vilarinho, L.; D'Almeida, V.; Martinez-Pardo, M.; Pena-Quintana, L.; Dalmau, J.; Bernal, J.; Briceno, I.; Couce, M. L.; Rodes, M.; Vilaseca, M. A.; Balcells, S.; Grinberg, D. The p.T191M mutation of the CBS gene is highly prevalent among homocystinuric patients from Spain, Portugal and South America. *J. Hum. Genet.* 52: 388-389 (2007).

Vandeputte S. Brihoum M. Hubin X. Georges M. Charlier C. Desmecht D. Guyot H. Rollin F. Congenital Muscular Dystonia (CMD) : a new Congenital

Pathology in Belgian Blue Calves. *Proc of World Buiatrics Congress, Nice* (2006).

Verloes A, Lambotte C. Further delineation of a syndrome of cerebellar vermis hypo/aplasia, oligophrenia, congenital ataxia, coloboma and hepatic fibrosis. *Am J Med Genet* 32, 227–232 (1989).

Weaver A.D. Muscle and Tendon Injuries – Lameness above the Foot. In: *Bovine Medicine*; Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd M., Eddy R.G. Blackwell Publishing (2004).

Weisbrode S.E. Disease of the Joint – Bone and Joints. In *Pathological Basis of Veterinary Disease*; McGavin M.D., Zachary J.F. Mosby Elsevier (2007).

Wooddard J.C. Abnormalities of Joints Development – Skeletal System. In *Veterinary Pathology*; Jones T.C., Hunt R.D., King N.W. Williams & Wilkins. (1997)

Yoshikawa H., Fukuda T., Oyamada T., Yoshikawa T. Congenital Hepatic Fibrosis in a Newborn Calf. *Vet Pathol* 39, 143-145 (2002).

Young G.B. Outline of Clinical Genetics. In: *Bovine Medicine*. Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd M., Eddy R.G. Blackwell Publishing (2004).

Zhang Y., Fujii J., Phillips M.S., Chen H.-S., Karpati G., Yee W.-C., Schrank B., Cornblath D.R., Boylan K.B., MacLennan D.H. Characterization of cDNA and genomic DNA encoding SERCA1, the Ca(2+)-ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for Brody disease. *Genomics* 30, 415-424 (1995).