

# *Alma Mater Studiorum - Università di Bologna*

Facoltà di Medicina Veterinaria  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale  
Servizio di Anatomia Patologica

Dottorato di Ricerca in  
Discipline Anatomoistopatologiche Veterinarie  
VET/03 Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria  
XIX ciclo

Tesi di Dottorato

**“SISTEMA NERVOSO ENTERICO E SCRAPIE  
SPERIMENTALE IN OVINI DI RAZZA SARDA CON  
DIVERSA SUSCETTIBILITÀ GENETICA NEI  
CONFRONTI DELLA MALATTIA”.**

*“ENTERIC NERVOUS SYSTEM AND ORAL EXPERIMENTAL  
SCRAPIE INFECTION IN SARDA BREED SHEEP WITH DIFFERENT  
GENETIC SUSCEPTIBILITY TO THE DISEASE”.*

Tesi di Dottorato di: **Dott.ssa Daniela Malatesta**

Docente Guida:  
**Chiar.mo Prof.  
Giovanni Di Guardo**

Coordinatore:  
**Chiar.mo Prof.  
Paolo Stefano Marcato**

**Anno Accademico 2005 - 2006**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>SUMMARY</b>	3
<b><u>PARTE PRIMA</u></b>	5
<b>1.1 LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI (TSE)</b>	6
1.1.1 Caratteristiche generali	6
1.1.2 L'agente patogeno	11
1.1.3 La proteina prionica cellulare (PrP <sup>C</sup> ) e le sue funzioni	17
1.1.4 Le basi genetiche della suscettibilità/resistenza alle TSE, con particolare riferimento alla Scrapie	20
<b>1.2 SCRAPIE OVINA</b>	24
1.2.1 Epidemiologia e modalità di trasmissione	24
1.2.2 Caratteristiche cliniche e neuropatologiche	28
1.2.3 Patogenesi, ruolo del sistema linfo-reticolare (LRS) associato all'intestino (GALT) e del sistema nervoso enterico (ENS)	31
1.2.4 Diagnosi immunohistochimica ed immunobiochimica ( <i>Western blot</i> )	39
<b>1.3 SISTEMA NERVOSO ENTERICO</b>	41
1.3.1 Struttura e funzione	41
1.3.2 Enteroglia	47

<b><u>PARTE SECONDA</u></b>	51
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	52
<b>2.1 MATERIALI</b>	55
2.1.1 Animali	55
<b>2.2 METODI</b>	56
2.2.1 Immunoistochimica	56
2.2.2 Immunofluorescenza indiretta	59
2.2.3 <i>Whole-mount</i>	60
2.2.4 <i>Western blot</i>	61
<b>2.3 RISULTATI</b>	62
<b>2.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	67
<b><u>ICONOGRAFIA</u></b>	70
Legende foto	71
<b><u>BIBLIOGRAFIA CITATA E CONSULTATA</u></b>	75
<b><i>RINGRAZIAMENTI</i></b>	

## RIASSUNTO

Sebbene il sistema nervoso enterico (“*enteric nervous system*”, ENS) svolga un ruolo cruciale nella patogenesi della Scrapie ovina, non esistono tuttavia in letteratura dati sulle popolazioni cellulari progressivamente coinvolte nel corso dell’infezione, né sugli eventuali danni morfo-funzionali da esse subiti.

Il presente studio è stato condotto sui plessi mienterici e sottomucosi dell’ileo di 46 pecore di razza Sarda, recanti diversi polimorfismi del gene *Prnp* (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, ARR/ARR). I suddetti animali, infettati *per os* all’età di 8 mesi con un ceppo di Scrapie precedentemente caratterizzato nel topo, sono stati sacrificati mediante eutanasia a determinati intervalli di tempo post-infezione (p.i.). E’ stata quindi valutata, tramite immunoistochimica ed immunofluorescenza indiretta su sezioni tissutali e su preparati “*wholemout*”, l’immunoreattività (IR) nei confronti della PrP<sup>Sc</sup>, del “*marker*” pan-neuronale Hu C/D, dell’ossido-nitrico sintetasi (nNOS), della calbindina (CALB) e della proteina fibrillare acida gliale (GFAP).

In 8 pecore con genotipo ARQ/ARQ, clinicamente sane e sacrificate a 12-24 mesi p.i., nonché in 5 ovini clinicamente affetti (2 con genotipo ARQ/ARQ, 3 con genotipo ARQ/AHQ), questi ultimi sacrificati rispettivamente a 24, 36 e 40 mesi p.i., le indagini immunoistochimiche hanno consentito di dimostrare la presenza di PrP<sup>Sc</sup> a livello sia dell’encefalo (*obex*), sia dell’ENS, in particolar modo nei plessi mienterici. In tali distretti il deposito della PrP<sup>Sc</sup> risultava pienamente compatibile con un interessamento delle cellule enterogliali (“*enterogial cells*”, EGCs), mentre occasionalmente si notava un contestuale coinvolgimento della componente neuronale ivi residente.

In conclusione, i dati della presente indagine consentono di ipotizzare un verosimile coinvolgimento delle EGCs e dei neuroni residenti a livello dei plessi dell'ENS nella patogenesi della Scrapie sperimentale realizzata *per os* in ovini di razza Sarda.

**Parole-Chiave:** Ovino, Scrapie, sistema nervoso enterico, infezione sperimentale, patogenesi, proteina prionica cellulare, suscettibilità genetica, encefalopatie spongiformi trasmissibili, malattie da prioni.

## SUMMARY

The enteric nervous system (ENS) is believed to play a key role in the pathogenesis of sheep Scrapie infection, although no information exists on the ENS cytotypes which are progressively involved, nor on the morpho-functional damage of such cells in the time course of infection.

We investigated the ileal myenteric (MPs) and submucosal plexuses (SMPs) of 46 Sarda breed sheep carrying different PrP genotypes (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, ARR/ARR), which had been orally dosed with Scrapie at 8 months of age and euthanized at definite time intervals post-infection (p.i.). PrP<sup>Sc</sup> immunoreactivity (IR), along with pan-neuronal marker Hu C/D, nitric oxide synthase (nNOS), calbindin (CALB) and glial fibrillary acidic protein (GFAP)-IR, were evaluated by means of immunohistochemistry (IHC) and indirect immunofluorescence (IF) on paraffin-embedded sections and *wholemout* preparations.

Eight clinically-healthy ARQ/ARQ sheep euthanized at 12-24 months p.i., along with 2 ARQ/ARQ (euthanized at 24 months p.i.) and 3 ARQ/AHQ (euthanized at 36 and 40 months p.i., respectively) clinically-affected sheep, showed IHC evidence of PrP<sup>Sc</sup> in both their brain (*obex*) and ENS, especially in MPs. PrP<sup>Sc</sup> deposition was fully compatible with an involvement of enterogial cells (EGCs) and, occasionally, also with an involvement of neurons residing within ileal ENS plexuses.

In conclusion, EGCs and neurons residing within ileal ENS plexuses may be likely involved in the pathogenesis of oral experimental Scrapie infection in Sarda breed sheep.

**Key-Words:** Scrapie, sheep, enteric nervous system, experimental infection, pathogenesis, cellular prion protein, genetic susceptibility, transmissible spongiform encephalopathies, prion diseases.

**PARTE PRIMA**



## 1.1 LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI

### 1.1.1 Caratteristiche generali

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE), o malattie da prioni, sono un gruppo di malattie neurodegenerative ad esito invariabilmente fatale, comuni all'uomo e a diverse specie animali domestiche e selvatiche (Tabella 1).

Le TSE sono malattie neurologiche progressive caratterizzate da lunghi tempi di incubazione, da un esordio spesso subdolo e poco specifico, da un quadro clinico caratterizzato per lo più da una varietà di disturbi comportamentali e neurologici e, non meno importante, da una “trasmissibilità” nei confronti di più specie animali (domestiche, selvatiche e da laboratorio). Le lesioni, pressoché esclusivamente localizzate al sistema nervoso centrale (SNC) ed apprezzabili solo istologicamente, sono di tipo regressivo con quadri istopatologici distintivi che comprendono la degenerazione spongiforme a livello della sostanza grigia, vacuolizzazione e perdita neuronale, nonché astrogliosi/astrocitosi. Una peculiare e specifica caratteristica lesiva, da ritenersi assolutamente patognomonica è costituita dall'accumulo, a livello sia del SNC, sia di una più o meno folta gamma di tessuti periferici dell'ospite di un'isoforma patologica ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) di una normale sialoglicoproteina dell'ospite ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) di cui si dirà più approfonditamente in seguito, mentre risulta pressoché costante l'assenza di reazioni infiammatorie e/o immunitarie. La  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , i cui depositi possono talvolta organizzarsi sottoforma di placche, costituisce altresì un fondamentale “*marker*” utile ai fini della diagnosi di tali malattie.

**Tabella 1: Encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) animali ed umane (da Di Guardo e Marcato, 2002, con modifiche).**

ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI	OSPITE NATURALE	VIA DI TRASMISSIONE
Scrapie	Pecora, Capra, Mufone	Acquisita (es. Ingestione). Trasmissione orizzontale, trasmissione verticale (non chiara).
Encefalopatia spongiforme bovina (BSE)	Bovino	Ingestione di alimenti contaminati.
Malattia del dimagrimento cronico	Cervidi	Acquisita (es. Ingestione). Trasmissione orizzontale, trasmissione verticale (non chiara).
Encefalopatia spongiforme felina (FSE)	Felidi	Ingestione di alimenti contaminati con l'agente della BSE.
Encefalopatia trasmissibile del visone	Visone	Acquisita (ingestione), fonte sconosciuta.
Encefalopatia spongiforme degli ungulati esotici	Kudu, Nyala, Orice	Ingestione di alimenti contaminati con l'agente della BSE.
Scrapie "atopica"	Pecora, Capra	Fonte sconosciuta.
<i>Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy (BASE)</i>	Bovino	Fonte sconosciuta.
Kuru	Uomo	Ingestione di alimento contaminato.
Malattia di Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD)	Uomo	Ingestione di alimenti contaminati con l'agente della BSE. Trasfusioni di sangue infetto.
Malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica	Uomo	Sconosciuta; mutazione somatica o conversione spontanea della PrP <sup>C</sup> in PrP <sup>Sc</sup> .
Malattia di Creutzfeldt-Jakob iatrogena	Uomo	Esposizione accidentale a materiale CJD-infetto.
Malattia di Creutzfeldt-Jakob familiare	Uomo	Mutazioni del gene <i>PRNP</i> .
Sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	Uomo	Mutazioni del gene <i>PRNP</i> .
Insonnia Familiare Fatale (FFI)	Uomo	Mutazioni del gene <i>PRNP</i> .
Insonnia Sporadica Fatale	Uomo	Fonte sconosciuta.

Le TSE umane sono suddivisibili in tre gruppi: sporadiche, quali la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD); genetiche, quali la CJD familiare, la sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e l'insonnia familiare fatale (FFI); iatrogene, quali una minoranza dei casi di CJD. In campo animale, le più note fra queste malattie sono la Scrapie dei piccoli ruminanti (ovini e caprini), che costituisce il "prototipo" delle TSE, nonché l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) (Pocchiari, 1994; Prusiner, 1998). Ad accrescere l'interesse verso le TSE ha contribuito, a circa 10 anni dalla prima segnalazione della BSE nel Regno Unito (Wells et al., 1987), l'identificazione, avvenuta nel 1996 sempre in quel Paese, di una nuova TSE umana ("variante della CJD", vCJD) (Will et al., 1996), che è stata ascritta alla pregressa esposizione dell'uomo all'agente della BSE (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997). Di quest'ultimo peraltro, nel cui ambito era stato fino a prima riconosciuto

un unico ceppo (Pocchiari, 1994; Prusiner, 1998), ne è stato di recente caratterizzato un altro, responsabile di un peculiare fenotipo morboso (*Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopath.*, BASE) (Casalone *et al.*, 2004).

L'evento patogenetico cruciale comune a tutte le TSE è rappresentato dall'accumulo, a livello sia del sistema nervoso centrale (SNC), sia di una serie di tessuti periferici, dell'isoforma patologica (PrP<sup>Sc</sup>) di una normale sialoglicoproteina dell'ospite denominata "proteina prionica cellulare" (PrP<sup>C</sup>), quest'ultima caratterizzata da elevati livelli di espressione nei neuroni e, in minor misura, nelle cellule del sistema immunitario ed in numerosi altri tipi cellulari, mentre la sua funzione biologica rimane per molti versi oscura (Aguzzi e Polymenidou, 2004). Se da un lato, in proposito, l'impiego di adeguati modelli murini ("*PrP-knockout*") ha consentito di dimostrare che l'espressione della PrP<sup>C</sup> è necessaria ai fini dello sviluppo della malattia prionica (Bueler *et al.*, 1993), studi assai recenti hanno documentato, dall'altro lato, un'attività antiossidante ed un importante ruolo biologico esplicito da tale proteina nel metabolismo del rame (Aguzzi e Polymenidou, 2004), la cui omeostasi sarebbe da essa ripristinata in presenza di elevate concentrazioni di "radicali liberi dell'ossigeno" (Sakudo *et al.*, 2004). Inoltre, la localizzazione della PrP<sup>C</sup> nei sinaptosomi e la sua intima associazione con il rame in ambito presinaptico suggeriscono che essa possa svolgere un importante ruolo nella normale trasmissione nervosa, intervenendo pure nel metabolismo dell'ossido nitrico ("*nitric oxide*", NO) (Sorenson, 2001). L'NO è una piccola molecola sintetizzata ad opera dell'enzima NOS ("*nitric oxide synthase*"), ampiamente distribuita nell'encefalo e nel midollo spinale e capace di interagire con l'ossigeno, i superossidi ed alcuni metalli di transizione, risultando

implicata in numerose funzioni del SNC, ivi compresa la neurogenesi (Tessitore, 1998). A livello del tratto gastro-intestinale (“*gastrointestinal tract*”, GIT), l’NO è principalmente un neurotrasmettitore ad azione inibitrice nei confronti della muscolatura liscia ivi residente ed agisce inoltre come un neuromodulatore, inibendo o potenziando, a seconda dei casi, il rilascio di acetilcolina (ACh) e di sostanza P (SP) (Lincoln *et al.*, 1997).

Allo stato attuale delle conoscenze, molte sono le questioni che rimangono aperte, insolute o controverse nel contesto delle malattie da prioni. Una di queste attiene alla natura dell’agente causale, sebbene la “teoria prionica”, enunciata oltre 20 anni orsono (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998), sia di gran lunga quella più accreditata.

Altri fondamentali aspetti che permangono tuttora oscuri attengono ai meccanismi di replicazione dell’agente infettivo, nonché alla cinetica evolutivo-patogenetica dell’infezione. A tal proposito, aspetti di grande interesse sono emersi da recenti studi effettuati sia su modelli sperimentali murini (Heikenwalder *et al.*, 2005; Seeger *et al.*, 2005) che sulla Scrapie ovina (Ligios *et al.*, 2005), nei quali è stato dimostrato come particolari tipologie di flogosi cronica, quali la nefrite linfocitaria nei topi, al pari delle mastiti linfoproliferative croniche ad eziologia lentivirale nei piccoli ruminanti (ovini), siano in grado di aumentare la distribuzione tissutale della PrP<sup>Sc</sup>, permettendo in tal modo la colonizzazione di distretti dell’ospite in cui normalmente non risiederebbe l’infettività e consentendo in tal modo di documentare la presenza di infettività nell’urina dei suddetti animali (topi) (Seeger *et al.*, 2005).

La più probabile via di ingresso dell’agente della Scrapie nell’ospite naturale (pecora) sarebbe rappresentata dal tubo gastroenterico (GIT).

Ciononostante, gli intimi meccanismi patogenetici implicati nel trasporto del medesimo dal lume intestinale al SNC sono solo parzialmente noti. A tal proposito, nelle fasi iniziali dell'infezione è stato documentato il duplice coinvolgimento sia di determinati distretti del “sistema linforeticolare” (“*lymphoreticular system*”, LRS), quali tonsille palatine (Schreuder *et al.*, 1996) e placche del Peyer (Heggebo *et al.*, 2000), sia dell'ENS.

### 1.1.2 L'agente patogeno

L'agente infettivo responsabile delle TSE ha delle caratteristiche così peculiari da mettere in crisi uno dei dogmi centrali della biologia, ovvero l'unicità degli acidi nucleici come depositari e trasmettitori dell'informazione biologica. Tuttavia, indipendentemente dall'esatta natura dell'agente infettivo, i fattori più importanti sono rappresentati dalle sue caratteristiche patogene, che riguardano l'elevata resistenza ai comuni agenti fisici o chimici in grado di inattivare tutti gli altri microrganismi. I maggiori progressi nello studio dell'agente casuale delle TSE risalgono agli anni Sessanta, allorché si scoprì che tale agente veniva inattivato da sostanze che distruggono le proteine (proteasi, detergenti, acidi forti).

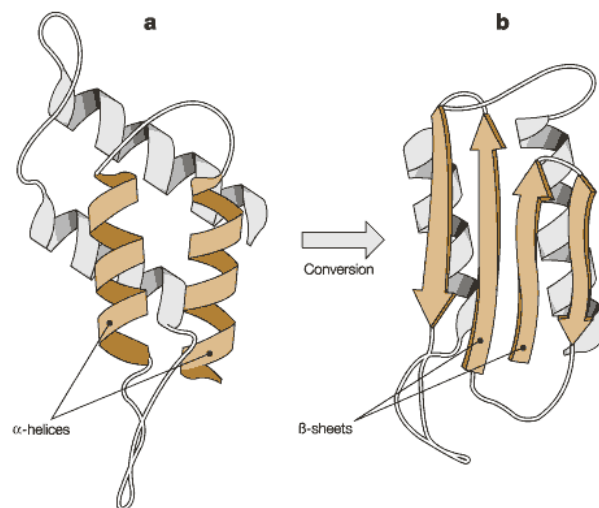
Nel 1982 Stanley Prusiner, riprendendo l'ipotesi proposta dal matematico J. Griffith nel 1967, secondo la quale l'agente di queste malattie poteva essere rappresentato da una proteina infettiva, introdusse il concetto di "prione" (acronimo di *Proteinaceous Infectious Particle*) e, cioè, di un agente infettante privo di acidi nucleici, distinto dai virus per la mancanza di una struttura propria e parzialmente resistente alla digestione con enzimi proteolitici (proteinasasi K).

L'agente patogeno delle TSE è stato pertanto identificato in una particella proteica, mancante di acidi nucleici apprezzabili: un prione, isoforma patologica ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) della normale proteina prionica cellulare ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), quest'ultima codificata ad opera del gene *Prnp* (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998). Nell'uomo il gene *Prnp* è localizzato sul braccio corto del cromosoma 20 ed esso codifica per un peptide che in forma matura è costituito da 253 aminoacidi e che si trova per lo più localizzato sulle membrane plasmatiche, con un ancoraggio di glicosil-fosfatidilinositolo (GPI) in corrispondenza della sua estremità C-terminale. Parte della

proteina, però, dopo essere arrivata in superficie, torna ciclicamente all'interno della cellula ove subisce un taglio ed un processo di maturazione in corrispondenza dei terminali carbossilico ed aminico, processo che comporta a sua volta la formazione di una proteina di 209 aminoacidi. In seguito una significativa porzione della proteina torna in superficie, mentre l'altra raggiunge gli endosomi e i lisosomi ove verrà infine degradata.

L'evento patogenetico cruciale in tutte le TSE umane ed animali è costituito da una modificazione conformazionale post- traduzionale della PrP<sup>C</sup> in una sua isoforma patologica (PrP<sup>Sc</sup>) (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998).

Tale modificazione si configura nel passaggio della proteina da una struttura secondaria e terziaria costituita prevalentemente da una conformazione ad  $\alpha$ -eliche (Figura 1a) ad una forma in cui prevale l'organizzazione a  $\beta$ -foglietti (Figura 1b) (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner *et al.*, 1982; Prusiner, 1998).



**Figura 1:** **a)** Struttura della proteina prionica cellulare (PrP<sup>C</sup>) con 4  $\alpha$ -eliche; **b)** Struttura della proteina prionica patologica (PrP<sup>Sc</sup>) con 2  $\alpha$ -eliche e 4  $\beta$ -foglietti, da Prion Biology and Diseases, Cold Spring Harbor laborator Press, New York, 1999.

Questi cambiamenti conformazionali conferiscono alla PrP<sup>Sc</sup>, ovvero all'agente infettante (il prione), delle caratteristiche nuove: esso diviene resistente al trattamento con proteinasi K ed insolubile in detergenti deboli (Sparkes *et al.*, 1986).

Il prione possiede, inoltre, alcune peculiari caratteristiche di infettività: esso può infatti propagare questa proprietà alla proteina prionica cellulare (PrP<sup>C</sup>) in maniera “autocatalitica”, cosicché i tessuti che lo albergano sono a loro volta in grado di trasmettere l'infezione ad altri ospiti “recettivi” (Borchelt *et al.*, 1990).

La PrP<sup>Sc</sup> ha un peso molecolare di 33-35 kDa e, se sottoposta all'azione della proteinasi K, viene parzialmente degradata perdendo 67 aminoacidi ed assumendo in tal modo un peso molecolare pari a 27-30 kDa. Proprio quest'ultima molecola, polimerizzando, dà luogo alle fibrille simil-amiloidotiche denominate SAF (*Scrapie-Associated Fibrils*). Tali fibrille, di 20 nm di diametro, 100-200 nm di lunghezza e composte da 2-3 protofilamenti dritti o talvolta attorcigliati, di 4-6 nm di diametro, si organizzano in depositi presenti a livello cerebrale in tutte le TSE umane ed animali (Prusiner, 1991).

I meccanismi molecolari che sono alla base del succitato processo di aggregazione/polimerizzazione della PrP<sup>Sc</sup> sono stati approfonditamente studiati da Prusiner, il quale è stato insignito del premio Nobel per la chimica nel 1997, per la sua oggi più che mai accreditata “teoria prionica”, che venne infatti definita “*protein-only hypothesis*” e che sostanzialmente si basa su due diversi modelli (Prusiner, 2001; Aguzzi e Polymenidou, 2004).

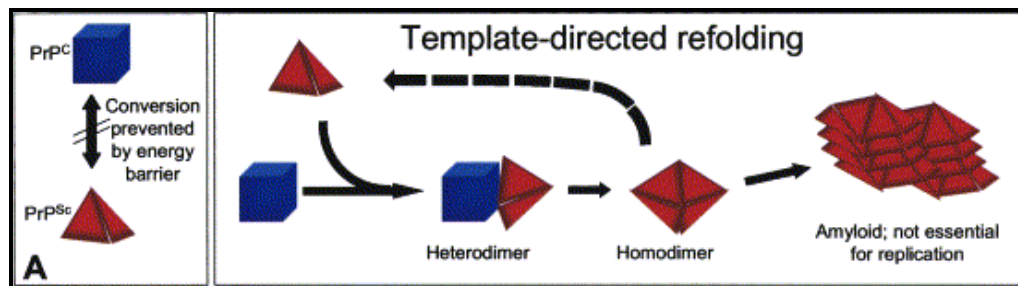
Il primo modello, denominato “*template-directed refolding*” postula l'interazione tra la proteina prionica “infettiva” esogena (PrP<sup>Sc</sup>) e la



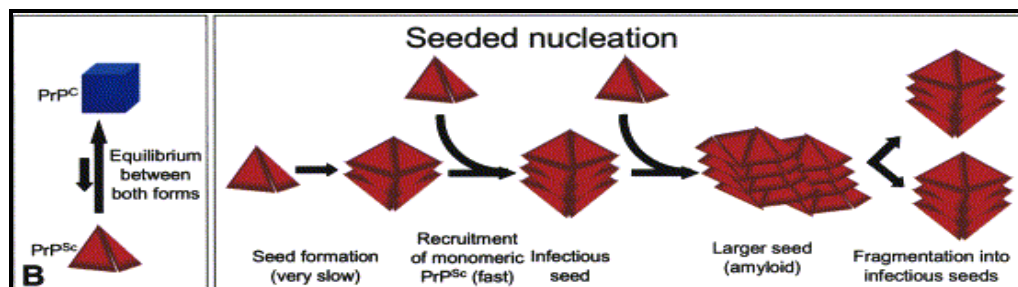
proteina prionica normale endogena ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), in seguito a cui quest'ultima viene indotta a trasformarsi nella  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ .

In condizioni di normalità un'elevata barriera energetica impedirebbe la conversione spontanea della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  nella  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Figura 2A).

Il secondo modello, denominato "seeded nucleation" o "nucleation-polymerization", postula invece che la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  coesistano in un equilibrio termodinamico reversibile. Il reclutamento e l'aggregazione in fibrille amiloidi di forme monomeriche di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  esita nella formazione di strutture altamente ordinate simil-cristalline, in cui la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  diviene stabile; la successiva frammentazione di tali aggregati aumenta il numero di nuclei di cristallizzazione, i quali possono reclutare altra  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e portare ad un'apparente replicazione dell'agente prionico (Figura 2B).



**Figura 2A:** Rappresentazione schematica del modello di conversione "Template-directed refolding" da Aguzzi e Polymenidou, 2004; con modifiche).



**Figura 2B:** Rappresentazione schematica del modello di conversione "seeded nucleation" o "nucleation polymerization" da Aguzzi e Polymenidou, 2004; con modifiche).

In realtà, sarebbe più opportuno definire tale processo un'amplificazione piuttosto che una replicazione, in quanto quest'ultima sarebbe una prerogativa degli agenti infettivi convenzionali dotati di un acido nucleico (Di Guardo e Marcato, 2002).

Alla teoria "prionica" di Prusiner, oggigiorno comprovata da numerose evidenze sperimentali (King *et al.*, 2004; Legname *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004) e pressoché universalmente accettata si contrappongono le ipotesi "virale" e del "virino". L'ipotesi "virale" cronologicamente antecedente a quella prionica è stata formulata per la prima volta da Sigurdsson nel 1954 e, secondo questa teoria, l'agente infettivo sarebbe stato costituito da un acido nucleico e da una o più proteine da esso codificate.

La terza ipotesi, del "virino" contempla la contestuale presenza di un acido nucleico "esogeno" e di una proteina codificata dall'ospite. Quest'ultima ipotesi, inoltre, al pari della teoria prionica giustificherebbe la mancanza di una risposta infiammatoria ed immunitaria specifica in corso di TSE sia umane che animali (Pocchiari, 1994).

Tuttavia, l'assenza di acidi nucleici, dimostrabili ha fatto sì che l'ipotesi prionica divenisse l'unica teoria pressoché universalmente accettata anche se la stessa mal si concilierebbe con l'esistenza di diversi ceppi di agente, una trentina, almeno per quanto riguarda la Scrapie degli ovicapri, tutti ben caratterizzati nel topo soprattutto attraverso lo studio del cosiddetto "profilo neuroistolesivo" (Bruce *et al.*, 1991). Le proprietà che distinguono i diversi ceppi di Scrapie includono il tempo di incubazione, la severità (il "grading") delle lesioni a carattere "spongiforme" in tutta una serie predefinita di aree cerebrali (sia nell'ospite naturale, sia nel topo) e le modalità di distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> in ambito encefalico (Di Guardo e Marcato, 2002). A dispetto di

quanto sopra, permangono tuttora oscuri i rapporti che legano i ceppi di Scrapie adattati ai roditori e quelli dell'ovino (González *et al.*, 2006).

### 1.1.3 La proteina prionica cellulare (PrP<sup>C</sup>) e le sue funzioni

Le modalità con cui il progressivo accumulo di PrP<sup>Sc</sup> determina la comparsa delle caratteristiche lesioni a carico del SNC (spinosi del neuropilo, vacuolizzazione e perdita neuronale, astrogliosi/astrocitosi) non sono state a tutt'oggi chiarite in maniera definitiva (Rezaie e Lantos, 2001; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006), tuttavia, sembra che queste lesioni siano la risultante di un abnorme accumulo della PrP<sup>Sc</sup> che i sistemi di degradazione cellulari dell'ospite non sono in grado di smaltire. La PrP<sup>Sc</sup> si accumulerebbe quindi nei lisosomi determinando una dispersione nel citoplasma del loro contenuto, costituito principalmente da enzimi litici, a cui seguirebbe un'attivazione, diretta o indiretta, dei canali recettoriali per l'N-metil-D-aspartato, che sono anche i canali ionici per il calcio. All'attivazione di tali canali si associa il conseguente aumento di ioni Ca<sup>++</sup> nei neuroni e l'incremento dell'osmolarità cellulare che ne deriva provocherebbe il rigonfiamento idropico-vacuolare che è alla base dell'alterazione "spongiforme" (Di Guardo e Marcato, 2002).

L'aumento della concentrazione di ioni Ca<sup>++</sup> sarebbe parimenti in grado di innescare la "cascata apoptotica", che nel contesto delle TSE svolgerebbe un importante ruolo patogenetico (Giese e Kretzschmar, 2001), sebbene recenti studi abbiano prodotto evidenze sperimentali che non vanno nella medesima direzione (Chiesa *et al.*, 2005)

Nell'ambito della morfogenesi delle lesioni, inoltre, non è parimenti noto se anche la perdita di funzione della PrP<sup>C</sup> possa esplicare un contestuale ruolo patogenetico (Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006).

Le funzioni biologiche della PrP<sup>C</sup> sono tuttora poco conosciute e recenti studi in materia hanno ipotizzato un suo possibile ruolo nel metabolismo del rame, un cofattore necessario per l'attività catalitica di diversi enzimi, proprio a livello del sistema nervoso (Waggoner *et al.*, 1999). La PrP<sup>C</sup>, essendo una sialoglicoproteina di membrana, potrebbe captare ioni rame presenti in sede extracellulare ed agire nei loro confronti come un *carrier* dall'esterno all'interno della cellula. A tal proposito, è stato dimostrato come il rame stimoli l'endocitosi della stessa PrP<sup>C</sup> attraverso vescicole ricoperte di clatrina (Pauly e Harris, 1998). È stato altresì ipotizzato che la PrP<sup>C</sup> possa sequestrare gli ioni rame in sede extracellulare e trasportarli all'interno della cellula mediante il proprio dominio transmembranario per poi "presentarli", attraverso il proprio dominio intracellulare, ad apposite proteine citoplasmatiche, proteggendo così i neuroni dalla tossicità del rame libero (Brown, 2001). Il rame svolge un ruolo di fondamentale importanza nell'omeostasi del SNC, così come in diverse malattie neurodegenerative umane ed animali, quali ad esempio la Sclerosi Laterale Amiotrofica e il Morbo di Alzheimer, in cui è stata documentata proprio un'alterazione dell'omeostasi del rame (Waggoner *et al.*, 1999).

Nelle malattie prioniche la perdita di funzione della PrP<sup>C</sup>, convertita a PrP<sup>Sc</sup>, determinerebbe uno squilibrio nel metabolismo del rame, il che spiegherebbe alcune caratteristiche biologiche delle TSE come la perdita neuronale e l'astrogliosi (Masters e Richardson, 1978; Chacòn *et al.*, 2003). La PrP<sup>C</sup>, pertanto, oltre ad avere un effetto protettivo nei confronti degli effetti tossici del rame, esplicherebbe anche un ruolo antiossidante. (Brown *et al.*, 1997; Brown, 2004; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006).

Tuttavia, la funzione neuroprotettiva della PrP<sup>C</sup> non sarebbe limitata al solo mantenimento dell'omeostasi del rame, ma sarebbe riconducibile anche al fatto che la sua mancanza darebbe origine ad un fenotipo sensibile allo stress ossidativo, che troverebbe il suo fondamento, seppure in parte, nell'alterata omeostasi del glutatione (GSH), uno dei principali regolatori dello stato "redox" cellulare. A tal proposito, studi sperimentali su colture cellulari infettate con i prioni hanno messo in evidenza alti livelli di perossidazione lipidica con diminuzione dell'attività degli enzimi antiossidanti superossodismutasi (SOD) e glutatione perossidasi (GSH-Px). Tutti gli studi sopra citati e numerosi altri supportano la teoria che la PrP<sup>C</sup> sia coinvolta nella regolazione dell'omeostasi ossido-riduttiva cellulare, e ciò contribuirebbe a spiegare l'alterata risposta e l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo da parte dei neuroni in corso di TSE (Vassallo e Hermes, 2003).

Infine recentissimi studi sperimentali attribuirebbero a questa proteina un ulteriore ruolo biologico sia nei processi di differenziazione cellulare, in particolar modo del tessuto nervoso (Steele *et al.*, 2006) sia nella progressione neoplastica del carcinoma gastrico. La PrP<sup>C</sup>, infatti, espressa ad alti livelli in tale tumore, esplicherebbe la propria funzione sia nel favorire la progressione neoplastica ed il successivo processo di metastatizzazione promuovendo l'attività e l'espressione della metalloproteinasi 11 (MMP11) (Pan *et al.*, 2006), sia mediante un'attività di tipo anti-apoptotica Bcl-2 dipendente, gli intimi meccanismi della quale, tuttavia, permangono ancora poco noti e per questo necessitanti, appunto, di ulteriori ed approfonditi studi, anche per quanto concerne le eventuali implicazioni terapeutiche (Liang *et al.*, 2006).

#### **1.1.4 Le basi genetiche della suscettibilità/resistenza alle TSE, con particolare riferimento alla Scrapie**

Nel 1953 Watson e Crick scoprirono che il codice genetico era contenuto in una molecola a doppia elica di acido deossiribonucleico (DNA), costituito da unità base denominate nucleotidi, ognuna delle quali formata da tre elementi chimici: una base azotata, un gruppo fosfato e una molecola di zucchero, il deossiribosio. Il DNA è presente in tutte le cellule nucleate del corpo ed è trasmesso alle generazioni discendenti, attraverso le cellule germinali dei mammiferi. Successivamente è stato scoperto che una delle funzioni più importanti del DNA era codificare le proteine. Queste ultime sono composte da lunghe catene di aminoacidi. Da studi più approfonditi è emerso quindi che il DNA codifica la sequenza aminoacidica delle proteine attraverso un gruppo di tre nucleotidi che costituiscono il codone, cosicché ogni codone codifica per un aminoacido.

I cromosomi sono formati da filamenti di DNA intrecciati; la progenie eredita i due filamenti, altrimenti denominati alleli, uno dal padre e uno dalla madre e così si forma una nuova coppia di cromosomi i cui geni codificheranno le medesime proteine. Infatti, le sequenze aminoacidiche che costituiscono una specifica proteina, rimangono in genere costanti di generazione in generazione e da animale ad animale all'interno della stessa specie. Raramente si verificano cambiamenti in uno o più codoni, con successiva comparsa, qualora si tratti di mutazioni "non silenti", di una differente sequenza aminoacidica. Queste variazioni sono conosciute come polimorfismi. Nonostante si ritenga che i succitati polimorfismi esercitano di regola effetti pressoché irrilevanti nei confronti della sequenza aminoacidica prodotta, tuttavia nel caso della proteina prionica cellulare (PrP<sup>C</sup>), questi possono giocare un ruolo determinante ai fini

della modulazione della suscettibilità/resistenza genetica dell'ospite nei confronti delle TSE e, più in particolare, della Scrapie.

La suscettibilità o, al contrario, la resistenza genetica dell'ospite nei confronti delle TSE e, più in particolare, della Scrapie si esplicherebbe in una maggiore o minore tendenza da parte della struttura primaria della PrP<sup>C</sup>, caratterizzata da una prevalente organizzazione ad  $\alpha$ -eliche, a subire una modificazione strutturale e ad assumere una diversa conformazione (con prevalente organizzazione a  $\beta$ -foglietti), che si identifica appunto nell'isoforma patologica (PrP<sup>Sc</sup>). Questo processo trova le proprie radici in una serie di polimorfismi "non silenti" (o "codificanti") dislocati in determinate posizioni, o codoni, del gene della PrP (*Prnp*), elemento quest'ultimo da cui discenderebbe la sintesi di una proteina (PrP<sup>C</sup>) recante una o più sostituzioni aminoacidiche in corrispondenza dei succitati codoni (Pocchiari, 1994; Prusiner, 1998; Di Guardo e Marcato, 2002; Agrimi *et al.*, 2003).

Per quanto attiene alla specie ovina, ove pure la razza di appartenenza assume un ruolo rilevante in tale contesto, tre sono i "siti" polimorfici della PrP<sup>C</sup> in grado di condizionarne la maggiore o minore suscettibilità nei confronti della malattia. Tali polimorfismi, individuati nei codoni 136 (A/V, alanina/valina), 154 (R/H, arginina/istidina) e 171 (R/Q, arginina/glutamina o, più raramente, R/H, arginina/istidina) (Agrimi *et al.*, 2003), sarebbero coinvolti singolarmente in alcune razze, come ad esempio nella Suffolk (Goldmann *et al.*, 1994; Westaway *et al.*, 1994) o nella Sarda (Vaccari *et al.*, 2001) relativamente al codone 171, oppure in associazione, come ad esempio nella razza Cheviot in cui, oltre all'accertato ruolo del codone 171, è stato parimenti documentato il coinvolgimento del codone 136 (Goldmann *et al.*, 1994).



Assai recentemente, inoltre, sarebbe stato dimostrato il contestuale ruolo esplicito dal codone 168 nel modulare la suscettibilità/resistenza dell'ovino nei confronti della Scrapie (Kirby *et al.*, 2006), mentre la preoccupante segnalazione di numerosi casi di “malattia atipica” nella popolazione ovi-caprina in buona parte del continente europeo, Italia compresa (Le Dur *et al.*, 2005) certamente impone un'adeguata “rivisitazione” delle conoscenze e dei concetti più sopra esposti.

Le combinazioni “allelliche” possibili portano ad un totale di 27 genotipi (Tabella 2), sebbene negli ovini ne siano stati finora riscontrati solo 15 (Tabella 3), mentre nella razza Sarda il numero dei suddetti genotipi si riduce a 6 (Tabella 4).

**Tabella 2:** Combinazioni “allelliche” possibili nell'ambito dei 3 principali siti polimorfici (136, 154, 171) del gene *Prnp*.

136	154	171
AA	RR	QQ
AA	RR	QR
AA	RR	RR
AA	RH	QQ
AA	RH	QR
AA	RH	RR
AA	HH	QQ
AA	HH	QR
AA	HH	RR
AV	RR	QQ
AV	RR	QR
AV	RR	RR
AV	RH	QQ
AV	RH	QR
AV	RH	RR
AV	HH	QQ
AV	HH	QR
AV	HH	RR
VV	RR	QQ
VV	RR	QR
VV	RR	RR
VV	RH	QQ
VV	RH	QR
VV	RH	RR
VV	HH	QQ
VV	HH	QR
VV	HH	RR

(Legenda: A=alanina; H=istidina; Q=glutammina; R=arginina; V=valina)

**Tabella 3:** Classificazione rispetto alla Resistenza/Suscettibilità, nei confronti della Scrapie ovina, dei diversi genotipi, secondo il National Scrapie Plan (NSP) britannico.

	<b>GENOTIPI</b>	<b>RESISTENZA/SUCETTIBILITÀ</b>
<b>NSP1</b>	ARR/ARR	GENOTIPO MOLTO RESISTENTE
<b>NSP2</b>	ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	GENOTIPI RESISTENTI
<b>NSP3</b>	AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	GENOTIPI POCO RESISTENTI
<b>NSP4</b>	ARR/VRQ	GENOTIPO SUSCETTIBILE
<b>NSP5</b>	AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	GENOTIPI MOLTO SUSCETTIBILI

**Tabella 4:** Suscettibilità genetica nei confronti della Scrapie negli ovini di razza Sarda.

<b>GENOTIPO</b>	<b>SUSCETTIBILITÀ NEI CONFRONTI DELLA SCRAPIE</b>
ARR/ARR	Minima o nulla
ARR/ARH	Genotipo raro, per il quale mancano dati sulla suscettibilità. Si suppone tuttavia una suscettibilità scarsa.
ARR/AHQ	Genotipo raro, per il quale mancano dati sulla suscettibilità. Si suppone tuttavia una suscettibilità scarsa.
ARQ/ARR	Suscettibilità scarsa
ARQ/ARQ	Suscettibilità elevata
ARQ/AHQ	Suscettibilità elevata
AHQ/AHQ	Genotipo raro, per il quale mancano dati sulla suscettibilità. Si suppone tuttavia una suscettibilità scarsa.

## 1.2 SCRAPIE OVINA

La Scrapie è una TSE a distribuzione cosmopolita che è considerata endemica nel Regno Unito ed in molti altri Paesi del mondo e che risulta essere assente, tuttavia, in Australia ed in Nuova Zelanda. La malattia è stata descritta per la prima volta nel 1732 nel Regno Unito, mentre in Italia la prima segnalazione nell'ovino risale al 1977 in Piemonte (Cravero *et al.*, 1977).

Gli ospiti naturali della Scrapie sono la pecora, la capra ed il muflone e la malattia in genere si manifesta in animali adulti di età compresa tra i 2 e i 5 anni, riscontrandosi raramente in animali di età inferiore ai 18 mesi, poiché il periodo di incubazione è molto lungo e varia da molti mesi fino a 4-5 anni. Il decorso clinico è generalmente compreso tra le 8 e le 24 settimane (Di Guardo e Marcato, 2002).

Per lungo tempo è rimasta l'unica TSE conosciuta ed in quanto tale ritenuta appunto, il “prototipo” di queste malattie (Pocchiari, 1994; Prusiner, 1998).

### 1.2.1 Epidemiologia e modalità di trasmissione

L'epidemiologia della malattia, ancora non completamente chiarita, presenta alcuni peculiari aspetti, uno dei quali è la prevalenza all'interno degli allevamenti che si mantiene tendenzialmente a livelli modesti (con una mortalità che oscilla in genere fra il 3 ed il 5% dell'intero effettivo), con casi sporadici nel corso dell'anno.

La Scrapie mostra in maniera più spiccata rispetto alle altre TSE, unitamente alla già ricordata CWD), le peculiarità proprie di una malattia infettiva a carattere contagioso.

In proposito, sebbene le vie di trasmissione non siano del tutto conosciute, è noto che l'agente della Scrapie può persistere per anni nell'ambiente contaminato e si ritiene che la placenta di pecore infette, che partoriscono sui pascoli, possa rappresentare una significativa fonte di infezione nei confronti di altri ovini.

Approfondite indagini sperimentali condotte su pecore gravide hanno altresì consentito di ottenere tutta una serie di prove a supporto della trasmissione materno-fetale dell'infezione, ottenuto a seguito del trasferimento di embrioni di pecore sane in riceventi infette (Dickinson *et al.*, 1974; Wrathall, 1997). A dispetto di quanto sopra, tuttavia, non risulta nota l'efficienza della trasmissione dell'infezione per via intra-uterina, così come non è stata mai accertata la presenza di infettività nel parenchima mammario di pecore affette da Scrapie, condizione quest'ultima destinata tuttavia, ad essere verosimilmente contraddetta dagli sviluppi di un recente studio in cui all'interno delle lesioni flogistiche a carattere linfo-proliferativo, presenti nella mammella di pecore naturalmente confettate dall'agente della Scrapie e dal lentivirus della Maedi-Visna ("Maedi-Visna virus", MVV), è stato possibile dimostrare consistenti depositi di PrP<sup>Sc</sup> (Ligios *et al.*, 2005), in pieno

accordo con quanto già ottenuto in precedenza su analogo modello sperimentale murino (Heikenwalder *et al.*, 2005; Seeger *et al.*, 2005).

L'agente causale può essere eliminato dagli animali infetti sia durante la lunga fase preclinica che durante la fase sintomatica dell'infezione, inoltre, sembrerebbe sussistere un effetto dose-risposta, nel senso che tanto più lunga e precoce è l'esposizione degli animali sani, tanto maggiore risulterà l'incidenza nell'allevamento, con un accorciamento dei tempi di incubazione. Tale ipotesi è supportata anche dal fatto che si assisterebbe ad maggiore incidenza della malattia nei soggetti nati da madri infette in greggi allevati a scopo commerciale (Dickinson *et al.*, 1974). Tuttavia, la trasmissione materna non sarebbe in grado di giustificare da sola la dinamica di diffusione dell'infezione all'interno di un gregge; infatti, l'esistenza di ulteriori meccanismi di trasmissione orizzontale sarebbe dimostrata dal fatto che l'introduzione di soggetti precedentemente esposti all'agente di malattia in un gregge di animali indenni comporta la diffusione dell'infezione tra questi ultimi. Al riguardo, andrebbe parimenti sottolineato che le esatte modalità attraverso cui gli animali contraggono l'infezione non sono del tutto chiare, sebbene la via orale venga ritenuta quella più verosimile. Ciononostante, non sono stati finora dimostrati livelli di infettività misurabili nelle numerose matrici biologiche potenzialmente implicate nella trasmissione dell'infezione (latte, feci, urine, saliva, liquido seminale, ecc.), ad eccezione dell'urina dei topi sopra citati (Seeger *et al.*, 2005), della saliva di cervidi affetti da CWD (Mathianson *et al.*, 2006) e, cosa di ben maggiore rilievo della placenta, che rimane quindi una delle principali fonti di contaminazione dei pascoli e di infezione per gli animali (Pattison *et al.*, 1972, 1974). L'agente causale, oltre che attraverso la via orale, può infettare l'ospite anche attraverso lesioni

cutanee (Taylor *et al.*, 1996). Alla luce di recenti studi, inoltre, è stato documentato che l'infettività, in corso di Scrapie ovina si rileva costantemente a livello di encefalo, linfonodi retrofaringei e mesenterici, tonsilla palatina, milza, placenta e tratto gastro-intestinale (“*gastro-intestinal tract*”, GIT), più in particolare a livello di ileo e colon. Parimenti è stata dimostrata l'infettività a livello di liquido cefalo-rachidiano, del nervo sciatico, delle ghiandole surrenali e della mucosa nasale, nonché dei muscoli scheletrici (Andréoletti *et al.*, 2004), della lingua (Casalone *et al.*, 2005), del rene (Sisò *et al.*, 2006) e, con ogni probabilità anche della mammella (Ligios *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Caratteristiche cliniche e neuropatologiche

Il fenotipo clinico-patologico della malattia risulta essere influenzato sia dal ceppo di agente coinvolto che dalla suscettibilità genetica dell'individuo (Pocchiari, 1994; Di Guardo e Marcato, 2002); come è noto, infatti, che il genotipo dell'ospite svolge un ruolo cruciale nel modulare, a seconda dei casi, la suscettibilità o la resistenza nei confronti della malattia, nella specie ovina così come nell'uomo, nel topo, nella capra e nei cervidi (Di Guardo e Marcato, 2002). Il ruolo degli individui di sesso maschile che, pur contraendo l'infezione non sarebbero tuttavia in grado di trasmettere l'agente infettivo per via genitale, rimane pertanto quello di trasmettere alla propria discendenza un profilo genetico più o meno "resistente", condizionando in tal modo la suscettibilità della progenie nei confronti della malattia.

Durante la fase di incubazione l'agente patogeno subisce un'intensa attività replicativa negli organi e nei tessuti linfatici dell'ospite, ivi compresa la milza, sebbene esso sia in grado di esplicare i propri effetti lesivi soltanto sul SNC, che raggiunge per via neurotrofica intra-assonale e/o per via ematogena, ad una velocità che si ritiene essere inferiore, tuttavia, rispetto a quella di virus neurotrofici "convenzionali" (Pocchiari, 1994).

Le prime manifestazioni cliniche consistono in genere in disturbi comportamentali caratterizzati da ipereccitazione, aggressività, nervosismo, paura, stato stuporoso e depressione del sensorio, cui fanno seguito progressivamente fenomeni di atassia locomotoria, che esitano a loro volta in una paralisi flaccida o spastica del treno posteriore (Ligios *et al.*, 1999; Di Guardo e Marcato, 2002). Un altro sintomo caratteristico della Scrapie ovina, seppure non patognomonico, risulta essere il prurito, che porta gli animali a grattarsi (*to scrape*) strofinando insistentemente il

corpo e la testa contro ostacoli fissi quali steccati ed altre strutture dell'allevamento, fino a procurarsi più o meno estese lesioni cutanee con perdita del vello. Gli animali colpiti pervengono infine *ad exitus*, spesso in condizioni di grave deperimento organico (Di Guardo e Marcato, 2002).

L'esame necroscopico degli animali che giungono a morte naturale permette di mettere in evidenza, in numerosi casi, segni di deperimento organico, eventuali abrasioni cutanee autoindotte mediante il grattamento e/o lo strofinamento contro oggetti fissi, sebbene nessuna lesione si renda macroscopicamente evidente a carico del SNC, eccezion fatta per i rari casi in cui è possibile osservare una lieve ectasia dei ventricoli laterali associata ad un modico aumento del liquido cefalo-rachidiano.

Le lesioni istologiche, rilevabili esclusivamente a livello del SNC e, più in corrispondenza dei nuclei telencefalici, ipotalamici, talamici, del corpo striato, del peduncolo cerebellare, del cerevelletto, del midollo allungato ed in minor misura della corteccia cerebrale e del midollo spinale, risultano variabili per intensità e distribuzione. Tali lesioni che mostrano una caratteristica distribuzione bilaterale e simmetrica, sono rappresentate da spongiosi a livello della sostanza grigia e, in minor misura ed in maniera incostante a livello della sostanza bianca, la degenerazione neuronale con conseguente perdita neuronale ed, infine, da una astrogliosi/astrocitosi (Di Guardo e Marcato, 2002).

Nella Scrapie ovina, la lesione d'importanza diagnostica, seppure non patognomica, si identifica nella spongiosi del neuropilo e nella vacuolizzazione neuronale, caratterizzata quest'ultima dalla presenza di vacuoli citoplasmatici piuttosto ampi, con margini netti, singoli o multipli, eccentrici, in genere otticamente vuoti, talvolta contenenti



globuli acidofili costituiti da ammassi di frammenti di membrane plasmatiche in degenerazione. Detta lesione, che si può rinvenire associata ad altre alterazioni neuronali regressive quali l'iperbasofilia citoplasmatica, la cromatolisi e la coagulazione, si riscontra pressoché costantemente a livello del nucleo motore dorsale del nervo vago ("*dorsal motor nucleus vagus nerve*", DMNV), della formazione reticolare e dei nuclei vestibolare mediale, cuneato laterale e palloniforme. Alle sopra citate lesioni si associano evidenti espressioni di astrogliosi/astrocitosi.

La spongiosi della sostanza grigia risulta in genere correlata, quanto ad intensità della medesima, al ceppo di agente in causa, al genotipo dell'ospite ed al periodo di incubazione; tali fattori sarebbero altresì in grado di influenzare sensibilmente l'intensità dell'astrogliosi/astrocitosi cerebrali e le modalità di deposito della PrP<sup>Sc</sup>, nonché la stessa distribuzione delle lesioni nelle diverse aree encefaliche (Pocchiari, 1994; Di Guardo e Marcato, 2002).

La spongiosi della sostanza bianca, dimostrabile pressoché esclusivamente all'indagine ultrastrutturale, è la risultante della degenerazione "palloniforme" dei dendriti neuronali e della vacuolizzazione del pericario.

Un reperto assai frequente, quantomeno nelle infezioni sperimentali dei roditori ed in alcune TSE umane, è inoltre costituito dalla presenza di depositi extracellulari di amiloide (PrP<sup>Sc</sup>), sotto forma di placche (placche amiloidee), nonché di depositi perivasali di PrP<sup>Sc</sup> (angiopatia amiloidea cerebrale); costante rimane, invece, la mancanza di aspetti reattivi propri dell'infiammazione sia nelle infezioni naturali che in quelle sperimentali (Di Guardo e Marcato, 2002).

### **1.2.3 Patogenesi, ruolo del sistema linfo-reticolare (LRS) associato all'intestino (GALT) e del sistema nervoso enterico (ENS)**

Sebbene venga pressoché unanimemente riconosciuto che l'agente della Scrapie possa penetrare nell'organismo prevalentemente per via alimentare, assai meno chiare risultano le modalità attraversamento della parete intestinale e di successivo raggiungimento degli organi bersaglio ad opera del medesimo. Le ipotesi patogenetiche formulate al riguardo possono essere ricondotte a tre possibili vie: la via linfo-ematogena, la via nervosa, o entrambe. Numerosi studi sono stati condotti, su modelli d'infezione sia naturale sia sperimentale, allo scopo di chiarire questa importante fase della patogenesi. A tal proposito, nelle fasi iniziali dell'infezione è stato documentato il duplice coinvolgimento sia di determinati distretti del LRS, quali tonsille palatine (Schreuder *et al.*, 1996) e placche del Peyer ("*Peyer's patches*", PPs) (Haggebo *et al.*, 2000), sia dell'ENS (Beekes *et al.*, 1998; van Keulen *et al.*, 1999; Beekes e McBride, 2000; Glatzel *et al.*, 2001; van Keulen *et al.*, 2002).

Più in dettaglio, a livello delle PPs e delle tonsille palatine risiedono le cosiddette "cellule M" ("*M cells*"), una popolazione cellulare precocemente coinvolta nella captazione e, plausibilmente, anche nella replicazione dell'agente infettivo (Mabbot e Bruce, 2001). Tali cellule costituiscono parte integrante del cosiddetto "linfoepitelio" o "epitelio follicolo-associato" ("*follicle-associated epithelium*", FAE) annesso all'intestino, cosicché a loro funzione potrebbe verosimilmente consistere nella precoce captazione di antigeni provenienti dal lume enterico e nel successivo trasporto dei medesimi alle cellule del sistema immunocompetente. A tal proposito, è stato infatti dimostrato che le cellule M possono essere utilizzate da diversi patogeni, quali virus e batteri, per attraversare la mucosa intestinale e raggiungere quindi, in tal

modo, i tessuti sottostanti (Neutra *et al.*, 1996); inoltre, accurati studi *in vitro* hanno parimenti consentito di dimostrare che tali cellule analogamente alle cellule dendritiche (“*dendritic cells*”, DCs) sarebbero in grado di fungere da “*carriers*” nei confronti dei prioni, permettendo a questi ultimi di attraversare l’epitelio intestinale (Heppner *et al.*, 2001), per essere quindi “presentati” alle cellule follicolari dendritiche (“*follicular dendritic cells*”, FDCs), localizzate queste ultime all’interno delle PPs (Mabbott e Bruce, 2002; Aguzzi e Heikenwalder, 2006; Mabbott e MacPherson, 2006). A supporto di ciò è stato dimostrato come la distruzione delle FDCs a livello della milza interferisce negativamente con la replicazione dell’agente della Scrapie, dato quest’ultimo che confermerebbe appunto che tali cellule costituiscono il sito principale di replicazione dell’agente in ambito di LRS (Montrasio *et al.*, 2000).

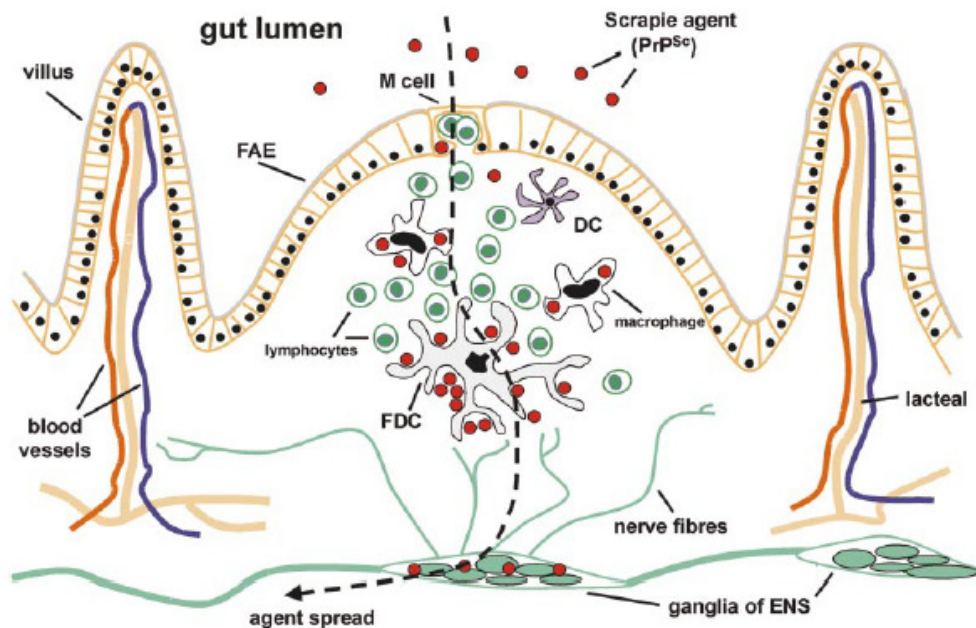
Tuttavia, nelle fasi precoci dell’infezione pure risulterebbero selettivamente coinvolte nella “captazione” dell’agente e nel conseguente accumulo della PrP<sup>Sc</sup> altre popolazioni cellulari quali i macrofagi a corpo tingibile (“*tingible body macrophages*”, TBMs), nonché i linfociti T ed i linfociti B, questi ultimi con il duplice ruolo, di elementi cellulari di cruciale importanza sia nel processo di maturazione delle FDCs, sia nella neuroinvasione in corso di Scrapie sperimentale murina (Klein *et al.*, 1997; Di Guardo e Marcato, 2002; Aguzzi e Polymenidou, 2004, Aguzzi e Heikenwalder, 2006; Mabbott e MacPherson, 2006).

Studi sulla Scrapie sperimentale nel topo e negli ovini, hanno chiaramente indicato che, dopo assunzione per via orale, l’agente infettivo replica nelle PPs, per poi raggiungere i linfonodi mesenterici per via linfatica e quindi, attraverso il circolo ematico, gli ulteriori siti di

replicazione nell'ambito del LRS (Hunter *et al.*, 2002). Dopo una fase di replicazione a questo livello, l'infezione diffonde, attraverso il sistema nervoso autonomo, sia al DMNV (via parasimpatica), sia ai gangli celiaco- mesenterico e mesenterico caudale (via simpatica) e da qui al midollo spinale, per risalire quindi fino al cervello (Maignien *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 2001), in cui la sede di più precoce colonizzazione ad opera dell'agente della Scrapie è rappresentata, con ogni probabilità, dal succitato DMNV (Di Guardo e Marcato, 2002; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006; Mabbott e MacPherson, 2006).

Tuttavia, l'ordine di coinvolgimento dei vari distretti tissutali dell'ospite, e cioè prima gli organi linfoidei periferici, poi il midollo spinale, infine l'encefalo, deporrebbe a favore di una disseminazione dell'agente infettivo attraverso i nervi periferici (Kimberlin *et al.*, 1983; Beekes e McBride, 2000; van Keulen *et al.*, 2000).

Le FDCs residenti all'interno dei follicoli linfatici delle PPs, riccamente innervati a loro volta da fibre nervose rapportantisi con i plessi dell'ENS (Lalatta-Costerbosa *et al.*, 2007), accumulano la PrP<sup>Sc</sup> durante le fasi più precoci dell'infezione (Figura 3), prendendo contatti mediante i loro lunghi prolungamenti con le fibre nervose ivi residenti, elemento quest'ultimo che giustificherebbe il ruolo cruciale da esso svolto nella progressione dell'infezione e nella conseguente neuroinvasione (Glatzel *et al.*, 2001; Mabbott e Bruce, 2001; Mabbott *et al.*, 2001, 2002, 2003; Heggebo *et al.*, 2003; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006; Mabbott e MacPherson, 2006); quest'ultima sarebbe altresì influenzata dalla distanza che intercorre tra le FDCs ed i nervi periferici (Prinz *et al.*, 2003).



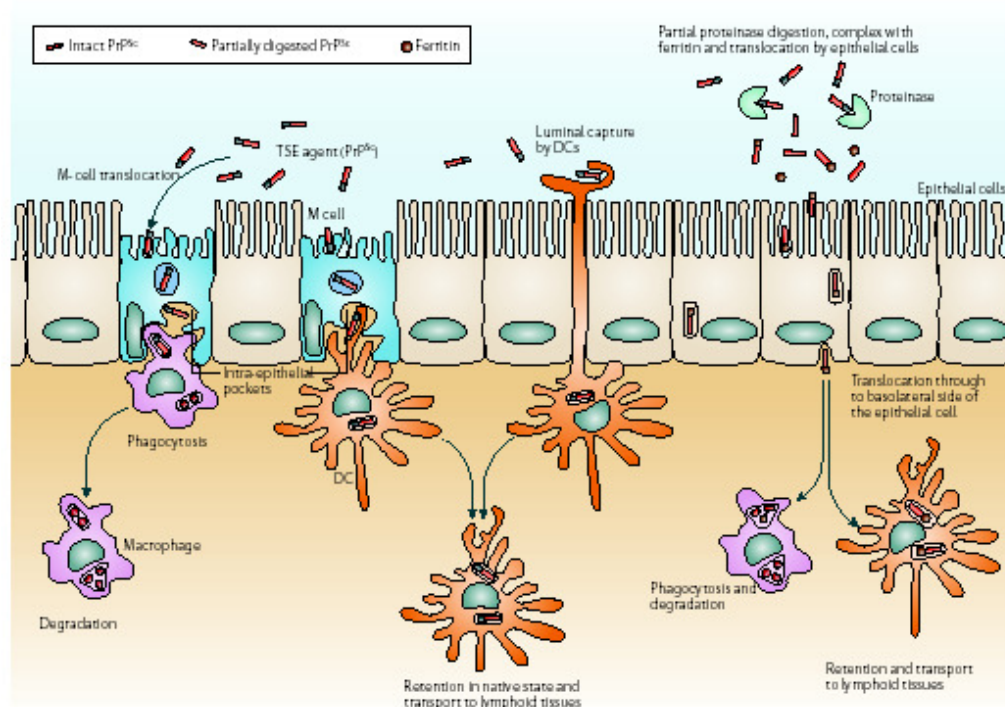
**Figura 3:** Rappresentazione schematica del “microambiente” presente a livello del distretto enterico nelle sue diverse articolazioni morfo-funzionali (PPs, plessi dell’ENS) e rilevanza di queste ultime ai fini della “neuroinvasione” operata dall’agente della Scrapie (da Mabbott e Bruce, 2001, con modifiche).

Alle sopra elencate modalità di ingresso del prione a livello intestinale se ne aggiungerebbe pure un’altra, che trae origine da studi sperimentali condotti su topi con varie forme di immunodeficienza geneticamente indotta o che non sono in grado di esprimere la PrP<sup>C</sup> sulla superficie delle cellule del LRS, nonché su colture di enterociti umani e, recentemente, anche su ovini, che avvalorerebbero l’ipotesi di un passaggio diretto dell’agente infettivo mediante meccanismi di endocitosi da parte degli enterociti (Lasmezás *et al.*, 1996; Race *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2000; Jeffrey *et al.*, 2006) (Figura 4).

In aggiunta a quanto sopra, sono stati recentemente descritti nella specie ovina casi di malattia naturale clinicamente manifesta anche in soggetti portatori del genotipo resistente ARR/ARR, la cosiddetta Scrapie “atipica”, in cui, a fronte del documentato riscontro di PrP<sup>Sc</sup> in sede

cerebrale, non se ne è dimostrata in alcun modo la presenza a livello di LRS (Benestad *et al.*, 2003; Le Dur *et al.*, 2005).

Ulteriori indagini sperimentali a supporto del fondamentale ruolo svolto dal sistema nervoso simpatico nella patogenesi della Scrapie sono stati condotti su modelli murini in cui è stata effettuata dapprima una simpatectomia, sia chimica sia immunologica, mediante la somministrazione di anticorpi nei confronti di specifici fattori neurotrofici e che sono stati successivamente infettati per via intraperitoneale, assistendo in tal modo ad una riduzione dell'infettività a livello di midollo spinale; in topi transgenici i cui organi erano stati resi maggiormente innervati dalla componente simpatica, si è assistito ad una considerevole riduzione del tempo di incubazione della malattia (Glatzel *et al.*, 2001).



**Figura 4:** Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi di ingresso e di successivo passaggio dell'agente infettivo attraverso l'epitelio intestinale; (da Mabbott e MacPherson, 2006, con modifiche).

Per quanto più ora concerne, più nello specifico, il ruolo patogenetico esplicato dall'ENS nel contesto delle malattie prioniche, questo risulterebbe ormai ampiamente documentato non solo nella Scrapie ovina (van Keulen *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 2001; van Keulen *et al.*, 2002; Di Guardo *et al.*, 2005, 2006; Mabbott e MacPherson, 2006), ma anche in altre TSE animali, quali la CWD dei cervidi (Sigurdson *et al.*, 1999) e l'encefalopatia spongiforme felina ("*feline spongiform encephalopathy*", FSE) (Ryder *et al.*, 2001), nonché, verosimilmente, anche nella vCJD dell'uomo, in cui è stato altresì dimostrato un elettivo coinvolgimento dei neuroni della componente simpatica (neuroni ad attività tirosin-idrossilasica o neuroni TH<sup>+</sup>) ad opera dell'agente causale (Haik *et al.*, 2003).

Depositi di PrP<sup>Sc</sup> assolutamente compatibili con il coinvolgimento dei neuroni e delle cellule enterogliali ivi residenti sono stati parimenti documentati a livello dei plessi dell'ENS in corso di Scrapie ovina sia naturale che sperimentale (van Keulen *et al.*, 1999; Andréoletti *et al.*, 2000; Di Guardo *et al.*, 2006). Ciò suggerisce la possibilità, una volta che l'agente patogeno sia penetrato nell'organismo per via orale, che esso possa diffondere dai neuroni dell'ENS direttamente al cervello attraverso le fibre del nervo vago o, in alternativa, al midollo spinale mediante altri tronchi nervosi del sistema nervoso autonomo (van Keulen *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 2001). Tuttavia, non si esclude una possibile via inversa di infezione, la via centrifuga, secondo la quale l'agente patogeno diffonderebbe dal SNC all'ENS (van Keulen *et al.*, 2000).

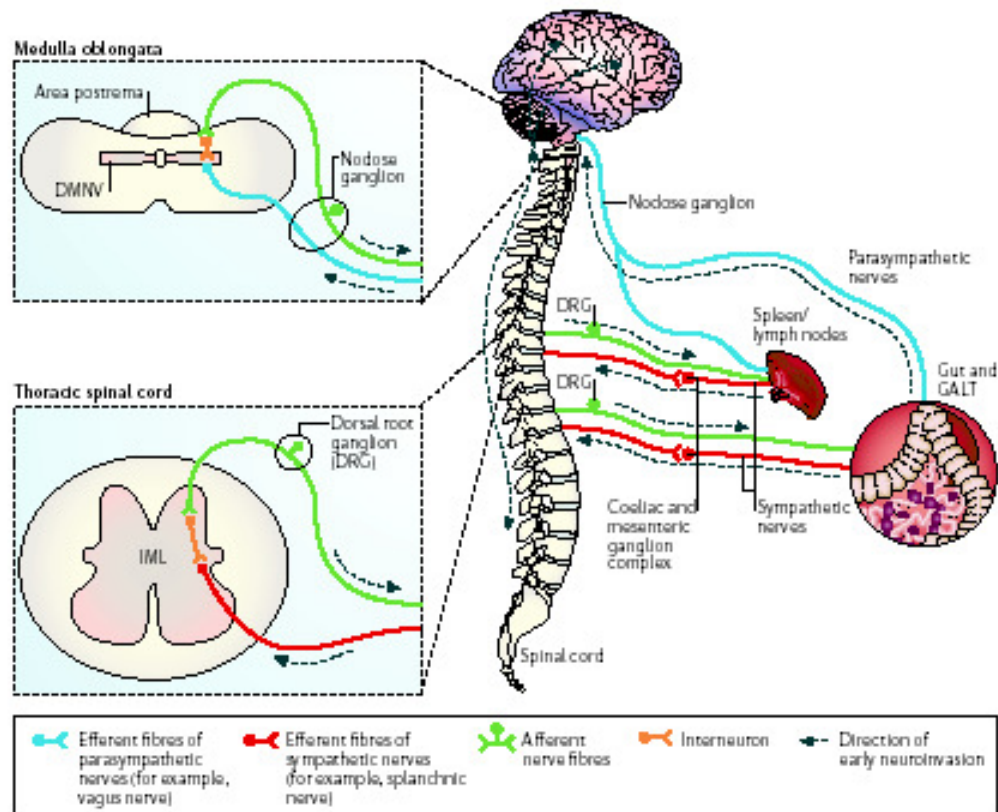
Da uno studio sperimentale effettuato su pecore con genotipo sensibile, infettate *per os* e sacrificate a diversi tempi post- infezione (p.i.), è emerso che la presenza di PrP<sup>Sc</sup> sarebbe dimostrabile immunostochimicamente dapprima solo a livello di ENS, per rendersi

successivamente manifesta a livello dei neuroni simpatici del ganglio celiaco-mesenterico (CMGC) e dei neuroni simpatici popolanti la colonna intermediolaterale (IMLC) del midollo spinale in corrispondenza dei segmenti T8-T10. Ciò dimostrerebbe una diffusione dell'agente infettante attraverso le fibre efferenti dei nervi splanchnici. Parimenti interessante, a tal proposito, risulta il dato relativo al contestuale riscontro di aggregati di PrP<sup>Sc</sup> anche a livello dei neuroni parasimpatici del DMNV localizzato a sua volta nel midollo allungato, evenienza quest'ultima che giustificherebbe appieno, come già accennato in precedenza, l'esistenza di un' ulteriore via di diffusione dell'agente attraverso le fibre efferenti del nervo vago (van Keulen *et al.*, 2000; McBride *et al.*, 2001).

Riassumendo, l'agente causale potrebbe verosimilmente raggiungere il SNC attraverso due vie nervose: le fibre efferenti (motrici) o afferenti (sensitive) del nervo vago e/o dei nervi splanchnici. A tal proposito, i corpi cellulari delle fibre efferenti del nervo vago risiedono nel DMNV e contraggono rapporti di sinapsi con i neuroni localizzati a livello dei plessi (sottomucoso e mienterico) dell'ENS, questi ultimi dislocati a loro volta lungo l'intera parete del canale digerente. I corpi cellulari delle fibre afferenti del nervo vago risiedono invece nel Nucleo Nodoso (NG) ed innervano direttamente il canale digerente (Figura 5). Queste fibre contraggono a loro volta rapporti sinaptici con una serie di interneuroni che proiettano al DMNV. I corpi cellulari delle fibre efferenti dei nervi splanchnici sono localizzati a livello della sopra citata IMLC del midollo spinale e contraggono a loro volta rapporti di sinapsi con i neuroni del ganglio CMGC innervanti il GIT. Le fibre afferenti dei nervi splanchnici, infine, originano in corrispondenza dei gangli delle radici dorsali (DRG),



corrono attraverso il CMGC ed innervano per via diretta i vari distretti del GIT (McBride *et al.*, 2001; Mabbott e MacPherson, 2006).



**Figura 5:** Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi coinvolti nel processo di “neuroinvasione” operato dall’agente infettivo lungo le vie nervose che connettono l’intestino al SNC (da Mabbott e MacPherson, 2006, con modifiche).

#### 1.2.4 Diagnosi immunoistochimica ed immunobiochimica

Come già precedentemente esposto, la diagnosi di certezza nei confronti della Scrapie, così come di qualsivoglia altra TSE animale ed umana, è possibile ottenerla solo al seguito dell'avvenuta dimostrazione, mediante opportune tecniche di indagine immunoistochimica e/o immunobiochimica (*Western blotting*, WB), della presenza di PrP<sup>Sc</sup> a livello sia del SNC, sia di tutta una serie di distretti del LRS e dei tessuti nervosi periferici dell'ospite, a proposito dei quali si è ampiamente riferito (Di Guardo e marcato, 2002; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006; Mabbott e MacPherson, 2006). Più in particolare, l'immunoistochimica consente di rilevare al microscopio ottico la presenza di depositi di PrP<sup>Sc</sup> in tessuti fissati in formalina neutra tamponata o in altri composti chimici, mediante l'utilizzo di specifici anticorpi primari (policlonali o monoclonali) nei confronti della PrP, che vengono fatti reagire a loro volta con una miscela di anticorpi secondari appositamente marcati con enzimi (es. perossidasi). Questa tecnica permette anche di valutare la localizzazione e la distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> all'interno di un determinato tessuto. Gli svantaggi di tale tecnica sono legati principalmente ai lunghi tempi di preparazione del campione per un'interpretazione corretta del risultato, Tant'è che sono necessarie diverse fasi che iniziano con la fissazione del tessuto, lo smascheramento dei siti antigenici della PrP<sup>Sc</sup> (qualora presente) e la distruzione – pressoché completa- della PrP<sup>C</sup>, passaggio quest'ultimo di fondamentale importanza in quanto gli anticorpi disponibili in commercio non sono in grado di discriminare le due isoforme della proteina.

L'altra metodica comunemente utilizzata, a sfondo prettamente "immunobiochimico", è rappresentata dal *Western blotting* (WB), che

può essere effettuato su tessuto fresco o congelato, sia nervoso sia linfatico, preventivamente omogenato e trattato con proteinasi K, presentando peraltro rispetto all'immunoistochimica il grande vantaggio di consentire l'ottenimento di una serie di informazioni utili anche ai fini della caratterizzazione del ceppo di agente responsabile della TSE di volta in volta studiata (Di Guardo e Marcato, 2002).

Il WB si articola in due fasi principali: nella prima il trattamento enzimatico con proteinasi K provvede a degradare la PrP<sup>C</sup> ed a digerire parzialmente la PrP<sup>Sc</sup>, producendo in tal modo un frammento residuo di peso molecolare pari a 27-30 kDa.

Nella seconda fase la PrP<sup>Sc</sup> (PrP 27-30 kDa), dopo corsa elettroforetica e trasferimento su un'apposita membrana, viene rivelata mediante un l'utilizzo di specifici anticorpi anti-PrP, capaci a loro volta di riconoscere (qualora trattisi di anticorpi monoclonali) diversi epitopi o regioni della proteina. La reazione viene infine evidenziata mediante chemiluminescenza.

## 1.3 SISTEMA NERVOSO ENTERICO

### 1.3.1 Struttura e funzione

L'esistenza e le funzioni dell'ENS, un sistema tanto affascinante quanto complesso, al punto tale da meritare la denominazione di "secondo cervello" ("*second brain*"), erano state intuite già ai primi del Novecento da Robinson (1907); il quale fu infatti uno dei primi ad affermare che nei mammiferi vi fossero due cervelli, l'uno localizzato in sede cranica, l'altro in cavità addominale, entrambi con caratteristiche pressoché sovrapponibili.

Successivamente, sulla base degli studi *in vitro* condotti da Langly (1921) emerse che l'intestino, possedendo una propria attività riflessa, doveva anche avere una certa indipendenza sia dal sistema nervoso autonomo (SNA) che dal SNC; tale indipendenza, inoltre, sarebbe stata possibile solo grazie alla presenza nell'intestino di recettori sensitivi, neuroni afferenti primari intrinseci, interneuroni e motoneuroni.

Per molti anni tali scoperte sono state ignorate, fino a quando l'attenzione di molti ricercatori si focalizzò sullo studio delle analogie biochimiche e morfo-funzionali esistenti fra cervello ed ENS. A tal proposito, infatti, si cercò di comprendere le modalità attraverso cui i due sistemi comunicavano e si scoprì che diversi neurotrasmettitori e neuromodulatori erano comuni ad entrambi (Gershon *et al.*, 1994). La comunicazione fra i due sistemi avverrebbe in modo analogo alla comunicazione interattiva tra una rete di computer collegati tra loro. I neuroni sensitivi afferenti e le loro estensioni intramurali trasferiscono le informazioni al SNC, svolgendo la funzione di anello cardine fra i due sistemi; viceversa, le informazioni verrebbero trasferite dal SNC all'ENS

attraverso le fibre del sistema nervoso simpatico e parasimpatico (Wood, 1994).

Attualmente è noto che l'ENS è costituito anatomicamente da due plessi, composti da neuroni e da cellule enterogliali ("*enteroglial cells*", EGCs), entrambi localizzati nello spessore della parete dell'intero tratto digestivo, che si estende dall'esofago all'ano: il plesso mienterico ed il plesso sottomucoso.

Il plesso mienterico, altresì denominato plesso di Auerbach localizzato nella tonaca muscolare fra lo strato muscolare longitudinale e circolare, ha come funzione principale quella di regolare la motilità del tratto digestivo, mentre il plesso sottomucoso o di Meissner, è costituito prevalentemente da neuroni sensitivi che rilevano le condizioni intraluminali e le "comunicano" ai neuroni del plesso mienterico. Le fibre ed i neuroni secreto-motori regolano il flusso sanguigno e controllano la funzione secernente delle cripte ghiandolari, ragion per cui ove tali funzioni sono ridotte, come ad esempio nell'esofago, i plessi generalmente mostrano una superficie ridotta ed una minore densità cellulare (Gershon *et al.*, 1994).

Il plesso sottomucoso presenta una peculiarità di rilievo nella specie ovina, oggetto della presente indagine: risulta, infatti, suddiviso in una componente esterna (plesso sottomucoso esterno o di Henle), strettamente connessa allo strato muscolare circolare, ed in una componente interna (plesso sottomucoso interno), adeso alla lamina *muscularis mucosae* (Timmermans *et al.*, 1992; Balemba *et al.*, 1999).

Studi effettuati sul topo hanno permesso di risalire alla caratterizzazione di tale sistema in senso embriologico. Sia i neuroni che le EGCs, di cui sono costituiti entrambi i plessi, originerebbero, infatti, dalle creste neurali che migrano da due diversi livelli dell'asse neurale e

precisamente, a livello vagale (in prossimità dei somiti 1-7) ed a livello sacrale (caudalmente al somite 24) (Burns e Le Douarin, 1998). I precursori originanti in sede vagale sono cellule multipotenti che migrano in senso rostro-caudale attraverso l'intestino, "escono" dal ciclo cellulare e si differenziano nei vari tipi neuronali dando luogo alla formazione dell'ENS (Burns *et al.*, 2004; Kapur *et al.*, 2004). A livello sacrale, invece, le cellule della cresta neurale sacrale entrano sequenzialmente nell'intestino solo dopo che questo è stato colonizzato dalle cellule della cresta neurale vagale; tuttavia, non si conoscono i dispositivi ed i meccanismi del controllo molecolare esercitato sullo sviluppo delle cellule della cresta neurale sacrale (Grundy e Schemann, 2005).

Le cellule derivate dalle creste neurali sono destinate a differenziarsi in due distinti citotipi, vale a dire i neuroni e le EGCs. Nell'uomo e nella cavia sono state identificate almeno 14 popolazioni neuronali fenotipicamente distinte e classificate in base alla morfologia, al tipo di neurotrasmettitore prodotto ed alle proprietà elettrofisiologiche dei neuroni sensitivi e viscerofugali, degli interneuroni ascendenti e discendenti dei motoneuroni eccitatori ed inibitori (Furness, 2002, 2003; Grundy e Schermann, 2005).

I neuroni sensitivi ricevono informazioni dai recettori sensitivi localizzati nella mucosa e nella compagine muscolare. Più nello specifico, a livello della mucosa si conoscono almeno cinque diversi tipi recettoriali che a loro volta rispondono a stimoli meccanici, termici, osmotici e chimici, nonché chemiorecettori che rilevano acidità e presenza di glucosio ed aminoacidi. I recettori sensitivi localizzati negli strati muscolari risentono principalmente delle modificazioni meccaniche della parete intestinale, mentre i neuroni sensitivi ricevono

informazioni da entrambe le succitate tipologie di recettori, mantenendo sotto controllo sia il contenuto intraluminale che le funzioni della parete gastrointestinale.

Gli interneuroni svolgono invece una funzione di “interfaccia” tra i neuroni sensitivi ed i motoneuroni, mentre questi ultimi controllano la motilità gastrointestinale, la secrezione ed in minor misura l’assorbimento. Per esplicare tutte queste delicate funzioni, i motoneuroni devono agire direttamente su un gran numero di cellule effettrici, comprese le cellule muscolari lisce, le cellule secetrici e le cellule gastrointestinali neuroendocrine.

Scarse sono le informazioni sull’ENS nella specie ovina, sia in condizioni di normalità che di patologia, nonostante siano disponibili in letteratura una serie di dati relativi alla caratterizzazione delle popolazioni cellulari ivi residenti (Chiocchetti *et al.*, 2004; Lalatta-Costerbosa *et al.*, 2007).

Recentemente, in uno studio sperimentale condotto sull’ileo di ovini da Chiocchetti *et al.* (2004), sono stati caratterizzati, infatti, almeno 4 distinti “morfotipi” neuronali oltre alle EGCs: neuroni Dogiel tipo 1, neuroni Dogiel tipo 2, neuroni multidendritici radiali (*radially multidendritic neurons*), neuroni multidendritici eccentrici (*eccentric multidendritic neurons*).

I neuroni Dogiel tipo 1 sono cellule multidendritiche con un unico assone; nell’intestino di pecora è stata riscontrata la presenza di cellule Dogiel tipo 1 di tipo sia “nitrinergico” che “dopaminergico”, in quanto immunoreattive rispettivamente nei confronti degli enzimi ossido nitrico sintetasi (nNOS) e tiroxina idrossilasi (TH). Rimangono a tutt’oggi sconosciute le funzioni di questo tipo di cellule, al contrario di quanto riguarda i neuroni Dogiel tipo 2, relativamente ai quali si è in possesso di

maggiori informazioni in ambito sia morfologico che funzionale. I neuroni Dogiel tipo 2 si caratterizzano, infatti, dal punto di vista strutturale, per la presenza di numerosi e lunghi processi che originano dal soma e contraggono rapporti sinaptici in numerosi gangli. I prolungamenti di questi neuroni, la maggior parte dei quali CALB-immunoreattivi (IR), si estendono fino alla mucosa (Kennedy e Mawe, 1998).

Nell' intestino tenue di cavia, tutti i neuroni CALB-IR proiettano i loro processi nella sovrastante mucosa, raggiungendo ogni singolo villo (Song *et al.*, 1994).

Per quanto attiene ancora alla specie ovina, questa particolare tipologia cellulare è stata identificata a livello sia dei plessi sottomucosi che dei plessi mienterici dell'ileo; tuttavia, l'immunoreattività nei confronti della CALB appare spesso poco apprezzabile e l'identificazione viene fatta per lo più su base morfologica. Questi neuroni, di tipo colinergico, sono le più grandi cellule a margini lisci osservate che presentino immunoreattività nei confronti della CALB (Ward *et al.*, 1992). I neuroni Dogiel di tipo 2 sono stati recentemente classificati come “neuroni afferenti primari intrinseci” (“*intrinsic primary afferent neurons*”, IPANs), essendo altresì caratterizzati dalla capacità di autostimolarsi attraverso la formazione di reti neuronali (Chiocchetti *et al.*, 2004).

I “neuroni multidendritici radiali” (“*radially multidendritic neurons*”), invece, sono cellule il cui soma appare di forma per lo più tondeggiante, talvolta allungata, con numerosi prolungamenti che originano dall'intera superficie della cellula. Questi elementi cellulari mostrano anch'essi un'intensa immunoreattività nei confronti della CALB essendo generalmente localizzati in posizione centrale nei gangli di dimensioni



medio-grandi, singolarmente o raggruppati in “*clusters*” da 2 a 4 fino a 17-19 cellule, disposte l’una vicina all’altra (Chiocchetti *et al.*, 2004).

I “neuroni multidendritici eccentrici” (“*eccentric multidendritic neurons*”) sono a loro volta elementi di dimensioni medio-grandi con il soma allungato, caratterizzati dalla presenza di processi citoplasmatici che emergono da uno dei due poli in numero variabile da 1 a 5 e che tendono a ramificarsi in branchie simil- varicose di dimensioni minori; dal polo opposto origina un unico lungo processo. La loro disposizione è in genere solitaria, mentre per la funzione, non ancora del tutto chiarita, si ipotizza che queste cellule possano esplicare un’attività secreto-motoria, in quanto ricordano morfologicamente le cellule di tipo IV identificate da Stach (1982) in tutti i plessi dell’ENS, soprattutto in quelli dell’ileo di maiale.

Queste cellule nell’ovino risultano anch’esse spiccatamente CALB-IR, con localizzazione del segnale prevalentemente in sede nucleare, talvolta citoplasmatica (Chiocchetti *et al.*, 2004).

### 1.3.2 Enteroglia

Come già esposto in precedenza, i due maggiori plessi dell'ENS, il mienterico e il sottomucoso, sono costituiti, oltre che da una componente neuronale, anche dalle EGCs, che con i neuroni, ivi residenti, condividono una medesima origine embrionale. Entrambe le suddette popolazioni cellulari, infatti, sono caratterizzate da un progenitore comune che origina dalle creste neurali e, in minor misura quindi nel distretto gastroenterico ove si differenzierà nell'uno o nell'altro citotipo (Gershon *et al.*, 1991).

Le EGCs, descritte per la prima volta da Dogiel nel 1899 come cellule nucleate che accompagnano i neuroni enterici, costituiscono una densa popolazione cellulare, numericamente ben più consistente rispetto ai neuroni.

Si tratta di elementi di ridotte dimensioni, di forma stellata, caratterizzate da numerosi processi cellulari di varia forma e lunghezza (Gabella, 1981), che a livello dei gangli si rinvengono localizzati in sede perineuronale, strettamente adesi a tali cellule.

Approfondite indagini ultrastrutturali hanno altresì consentito di documentare, all'interno delle EGCs, la presenza di filamenti di circa 10 nm di lunghezza, che si intersecano fra loro formando una sorta di asse nei processi cellulari e permettendo l'ancoraggio di tali cellule alla superficie dei gangli (Gabella, 1981). Il principale costituente di tali filamenti è rappresentato dalla proteina acida fibrillare gliale ("*glial fibrillary acidic protein*", GFAP), mentre in minor misura risultano presenti anche la vimentina e la proteina S100.

La GFAP è il "*marker*" d'elezione per la messa in evidenza, a livello intestinale, di questa tipologia cellulare, analogamente a quanto si verifica in sede encefalica nei confronti delle cellule astrogliali, che

rappresentano appunto, a questo livello, l'esatto corrispettivo delle EGCs (Cabarrocas *et al.*, 2003).

Per quanto concerne gli altri due "markers" sopra citati, la vimentina è espressa anche dai miofibroblasti (Rühl *et al.*, 2001), mentre la proteina S100 a livello di EGCs risulta anch'essa un buon "marker" al pari della GFAP (Ferri *et al.*, 1982).

La glia enterica risulta morfologicamente ed immunoistochimicamente differente dalle altre tipologie gliali centrali e periferiche, in particolar modo dalla microglia del SNC, che ha un'origine mesodermica, mentre sembra, al contrario condividere una serie di analogie con gli astrociti, prima fra tutte l'origine neuroectodermica (Rühl, 2005).

Le funzioni di questa popolazione cellulare sembrerebbero essere indispensabili per i neuroni; infatti, in studi effettuati su topi geneticamente deprivati della glia enterica, si è assistito a degenerazione neuronale (Bush *et al.*, 1998) e/o a specifici cambiamenti nel corredo neurochimico dei neuroni (Aube *et al.*, 2003), sebbene i meccanismi attraverso i quali la glia enterica nutre e supporta i neuroni siano tuttora largamente sconosciuti (Rühl, 2005). A tal proposito, l'enteroglia potrebbe partecipare al mantenimento dell'integrità neuronale principalmente attraverso tre meccanismi di supporto strutturale, rilascio di fattori neurotrofici e mantenimento di un microambiente idoneo (Cabarrocas *et al.*, 2003).

I plessi dell'ENS, essendo intimamente connessi agli strati muscolari della parete intestinale, sono soggetti a continue forze meccaniche e le EGCs ancorate alle pareti dei gangli ed alle fibre nervose attraverso i filamenti di GFAP "stabilizzerebbero" l'ENS garantendo ai neuroni un adeguato supporto strutturale.

Inoltre, gli accumuli di granuli di glicogeno intracitoplasmatici (Komuro *et al.*, 1982) e la produzione di fattori neurotrofici come il fattore neurotrofico gliale (“*glial-derived neurotrophic factor*”, GDNF) (Bär *et al.*, 1997), il fattore di crescita dei nervi (“*nerve growth factor*”, NGF), il fattore di crescita trasformante beta (“*transforming growth factor*”, TGF- $\beta$ ), la neurotrofina-3 (“*neurotrophin-3*”, NT-3) (Chalazonitis, 2004) garantiscono, oltre al mantenimento dell’omeostasi neuronale, la regolazione della permeabilità vasale dei capillari intestinali ad opera delle endoteline (Gershon e Bursztajn, 1978; von Boyen e Steinkamp, 2006).

I plessi dell’ENS, inoltre, non possiedono capillari al loro interno; questi sono infatti localizzati all’esterno, mentre le fibre nervose sono parzialmente ricoperte dalle EGCs, che con i loro estesi prolungamenti citoplasmatici avvolgono le pareti dei capillari formando una sorta di guaina. Tali capillari presentano alcune significative peculiarità, essendo caratterizzati da una parete più sottile dei normali capillari intestinali con un endotelio non fenestrato simile a quello dei capillari cerebrali. Ciò consentirebbe lo svolgimento di analoghe funzioni, prima fra tutte quella di proteggere il tessuto nervoso da eventuali fluttuazioni nella composizione del plasma, formando una sorta di barriera (Rühl, 2005). Un’altra importante funzione della glia enterica è quella di mantenere un equilibrio ionico favorevole all’omeostasi neuronale, regolando in particolare le concentrazioni degli ioni potassio derivanti dall’attività neuronale e rimuovendo gli eccessi di cationi in sede peri-neuronale (Hertz, 1965).

Alle succitate funzioni della glia enterica, numerose quanto più importanti, si aggiunge il rilevante ruolo che essa svolge nella neurotrasmissione, sia attraverso la sintesi di neurotrasmettitori, sia

partecipando direttamente alla trasmissione sinaptica. La glia enterica di diversi mammiferi, infatti, esprime l'enzima glutamina sintetasi, peculiarità che la rende una fonte inesauribile di glutamina per la sintesi di glutammato e di acido  $\alpha$ -aminobutirrico (GABA) (Galligan *et al.*, 2000); tuttavia la glia enterica oltre ad essere implicata nella trasmissione GABAergica, sembrerebbe svolgere un ruolo anche nella trasmissione nitrinergica, poiché l'immunoreattività nei confronti della L-arginina, precursore dell'ossido nitrico (NO), è stata dimostrata solo nelle cellule gliali, non nei neuroni (Nagahama *et al.*, 2001, Cabarrocas *et al.*, 2003).

Infine, la glia enterica gioca un ruolo cruciale anche nella regolazione della permeabilità intestinale, risultando una potenziale fonte di fattori difensivi nei confronti della mucosa (Rühl, 2005), prevenendo in tal modo la disorganizzazione ed un'eccessiva attività iperproliferativa dell'epitelio intestinale in corso di patologie a carattere infiammatorio, infettivo e neoplastico (Neunlist *et al.*, 2003).

## **PARTE SECONDA**

## 2. SCOPO DELLA TESI

A tutt'oggi è stato dimostrato che, in seguito ad infezione *per os* con l'agente della Scrapie, il primo "target" dell'infezione, insieme al "tessuto linfatico associato all'intestino", ("gut-associated lymphoid tissue", GALT) è rappresentato dall'ENS) (van Keulen *et al.*, 1999, 2002; Heggebo *et al.*, 2000, 2003). Oltremodo carenti risultano, tuttavia, le informazioni circa i rapporti esistenti, a livello sia cellulare, sia biochimico-molecolare, fra LRS ed ENS. Nella dinamica di quest'ultimo processo potrebbero essere coinvolti anche fattori genetici propri dell'ospite. È noto, infatti, come lo stesso genotipo dell'ospite sia fondamentale nel modulare, a seconda dei casi, la suscettibilità o la resistenza nei confronti delle malattie prioniche nella specie ovina, così come nell'uomo, nel topo, nella capra e nei cervidi.

Piuttosto scarse risultano inoltre, sia in condizioni di normalità, sia in animali infetti, le conoscenze relative al corredo neurochimico che caratterizza i neuroni dell'ENS nell'ovino (Chiocchetti *et al.*, 2003), al di là di alcuni significativi studi prodotti assai recentemente sull'argomento (Lalatta-Costerbosa *et al.*, 2007). Al riguardo nei plessi dell'ENS di cavia è stata messa in evidenza la presenza di almeno 14 distinte popolazioni neuronali (neuroni motori, sensitivi, viscerofugali, interneuroni), ciascuna con un peculiare corredo neurochimico ed una caratteristica funzione (Furness *et al.*, 2002, 2003).

Per quanto più specificatamente attiene alla patogenesi della Scrapie permangono a tutt'oggi oscuri i meccanismi che regolano il "trasferimento" dell'agente eziologico dal LRS alle fibre nervose da esso utilizzate per la successiva colonizzazione dei plessi dell'ENS, sia le modalità di trasporto del medesimo lungo le fibre nervose (Mabbott e Bruce, 2001; Kunzi *et al.*, 2002; Aguzzi e Polymenidou, 2004). Al

riguardo, un recente studio immunoistochimico ed ultrastrutturale su ovini da razza Suffolk con infezione subclinica ha documentato, a livello delle placche del Peyer digiuno-ileali, gli stretti rapporti esistenti tra fibre nervose e popolazioni cellulari ivi residenti, quali “cellule follicolari dendritiche” (“*follicular dendritic cells*, FDCs) “macrofagi a corpo tingibile” (“*tingible body macrophages*”, TBMs) e linfociti, elementi tutti capaci di accumulare PrP<sup>Sc</sup> e quindi di supportare, verosimilmente, la replicazione dell’agente (Heggebo *et al.*, 2003).

Un’ulteriore fondamentale questione patogenetica è quella che riguarda le modalità attraverso cui i neuroni residenti a livello dei plessi dell’ENS si rapportano con l’agente infettivo.

Uno degli obiettivi di questo lavoro è consistito nella caratterizzazione, in senso qualitativo e quantitativo, dei diversi tipi cellulari neuronali e non (enteroglia) residenti a livello dei plessi dell’ENS in ovini di razza Sarda sperimentalmente infettati *per os* con l’agente della Scrapie ed in soggetti di controllo della medesima razza, portatori di analoghi genotipi (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARR/ARQ, ARR/ARR).

Una delle domande “cruciali” al riguardo attiene alle modalità attraverso cui le diverse popolazioni cellulari si rapportano con l’agente infettivo, vale a dire se i suddetti neuroni si limitino a supportarne passivamente la replicazione o se, al contrario, subiscano una serie di alterazioni morfo-funzionali conseguenti all’interazione con l’agente medesimo. È opportuno ricordare, in proposito, che proprio in corrispondenza del “nucleo motore del nervo vago” (“*dorsal motor nucleus of vagus nerve*”, DNMV), da cui traggono origine le efferenze che si costituiranno appunto nei plessi dell’ENS, si registrano costantemente le più eclatanti ed al tempo stesso precoci espressioni morfo-lesive (spongiosi) riscontrabili a livello cerebrale in corso di Scrapie ovina. Un elemento



assolutamente meritevole di approfondimenti attiene qui alle modalità attraverso cui si estrinsecerebbe l'eventuale danno arrecato dall'agente infettivo ai neuroni dell'ENS, mediante uno studio sequenziale de fenomeni di tipo degenerativo coinvolgenti, in corso di Scrapie ovina, le diverse popolazioni cellulari neuronali e non (cellule enterogliali), residenti a livello dei plessi dell'ENS.

Poiché inoltre, come precedentemente sottolineato, il genotipo dell'ospite svolge un importante ruolo eziopatogenetico nella Scrapie ovina, ci si propone qui di studiare l'influenza esplicata da quest'ultimo nel condizionare o meno l'insorgenza di eventuali lesioni morfofunzionali a carico delle succitate popolazioni neuronali dell'ENS, nonché nel facilitare o nell'inibire la progressione dell'infezione.

In relazione a quanto sopra, la nostra scelta è stata quella di effettuare l'indagine su ovini di razza Sarda (la razza economicamente più importante nel nostro Paese e quella in cui, al tempo stesso, è stata più intensamente studiata la suscettibilità/resistenza genetica nei confronti della malattia), a loro volta recanti diversi polimorfismi del gene della PrP (*PRNP*) in corrispondenza del succitato codone 171.

## **2.1 MATERIALI**

### **2.1.1 Animali**

La presente ricerca è stata condotta su 46 pecore di razza Sarda, con genotipo diverso (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, ARR/ARR), tutti inclusi, come più sopra accennato, in una sperimentazione coordinata in ambito Nazionale dall'Istituto Superiore di Sanità. Gli animali sono stati infettati sperimentalmente *per os* all'età di 8 mesi con un ceppo di Scrapie precedentemente caratterizzato sul topo.

Gli animali sono stati stabulati e successivamente sottoposti ad eutanasia ad intervalli di tempo predeterminati rispettivamente a 9, 12, 16, 20, 24, 36, 40 mesi post-infezione, (p.i.), presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana. I 46 ovini in esame comprendevano inoltre 5 soggetti di controllo, non infettati, appartenenti allo stesso gruppo e recanti anch'essi i medesimi genotipi.

Per ogni animale sono stati campionati, in sede necroscopica, una serie di distretti del SNC, del sistema nervoso periferico (SNP) e dell'ENS, nonché le placche del Peyer a livello del digiuno, ileo, cieco, colon e valvola ileo-ciecale. Di tutti i suddetti tessuti una parte è stata prontamente fissata in formalina tamponata al 10% ed una parte congelata a -20°C.

## 2.2 METODI

Il materiale raccolto è stato successivamente utilizzato per le seguenti indagini:

- ♣ Immunoistochimica
- ♣ Immunofluorescenza indiretta
- ♣ *Whole-mount*
- ♣ *Western blot*

### 2.2.1 Immunoistochimica

I diversi segmenti di intestino, nonché tratti di ileo, precedentemente fissati in formalina tamponata al 10%, sono stati sottoposti ad una processazione tissutale della durata di 60, ore che ha previsto una fase di disidratazione negli alcoli, una fase di chiarificazione in toluene ed una fase finale di inclusione in paraffina.

Le sezioni tissutali di 5 µm di spessore, sono state quindi montate su vetrini trattati con doppia polilisinatura ed asciugate in stufa a 37°C per almeno 24 ore.

Tali sezioni, sparaffinate e reidratate sono state sottoposte ai seguenti passaggi:

- inibizione delle perossidasi endogene in una soluzione al 3% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in metanolo;
- smascheramento antigenico, secondo un protocollo tecnico recentemente in materia (Kovacs *et al.*, 2005). In breve, tale protocollo ha previsto l'immersione dei campioni per 2 minuti in acido formico al 96/98%, successivamente immersi in

tampone citrato a pH 6 e trattati termicamente in autoclave per 20 minuti a 100 C°;

- incubazione con siero normale di cavallo (Vector Lab., Inc., USA) per 20 minuti;
- incubazione con uno specifico anticorpo monoclonale anti-PrP, disponibile in commercio, (F99/97.6.1 MoAb, VMRD, Inc., USA), diluito 1:800 in tampone sodio fosfato salino (PBS) a pH 7 per 1 ora, in camera umida e ad una temperatura di 37 °C;
- incubazione con un anticorpo secondario “cavallo anti-topo” (horse anti-mouse) coniugato con biotina (Vector Lab., Inc., USA), diluito 1:200.

La reazione antigene-anticorpo è stata quindi evidenziata mediante l'utilizzo di un “kit” avidina-biotina-perossidasi (ABC Kit Vectastain *Elite*<sup>®</sup>, Vector Lab.), mentre le sezioni sono state cimentate con il cromogeno 3-3'-diaminobenzidina (DAB Kit, Dako) e colorate con l'ematosilina di Mayer (Merck) prima di essere disidratate e montate con resina sintetica DPX (Fluka). Come liquido di lavaggio è stato altresì impiegato il tampone tris buffer salino (TBS) a pH 7,6.

Lo smascheramento antigenico, effettuato secondo il succitato protocollo di Kovacs *et al.* (2005) è stato parimenti condotto in accordo con il protocollo elaborato dal Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie Animali (CEA) di Torino, da noi modificato, secondo cui, dopo un lavaggio in acido formico alla concentrazione del 96/98 % per 5 minuti, le sezioni di tessuto nervoso venivano immerse in acqua distillata, mentre i tessuti linfatici in tampone citrato (pH 6) e successivamente entrambi i preparati tissutali venivano sottoposti ad autoclavaggio a 121°C per 12 minuti. Quest'ultimo passaggio risulta

essere di fondamentale importanza non solo ai fini dello smascheramento antigenico, ma soprattutto perché non esistono anticorpi disponibili in commercio che siano in grado di discriminare la proteina prionica cellulare (PrP<sup>C</sup>) dalla sua isoforma patologica (PrP<sup>Sc</sup>), cosicché la distruzione dell'isoforma cellulare mediante questo pre-trattamento d'urto costituisce per ora un'opzione imprescindibile al fine di individuare con certezza la PrP<sup>Sc</sup>, qualora presente. A tal proposito, nel corso della nostra indagine sono state effettuate numerose prove volte a ridurre i tempi di trattamento termico in autoclave, al fine di ottenere la completa degradazione della PrP<sup>C</sup>, preservando al tempo stesso la morfologia dei tessuti oggetto di studio, nello specifico l'intestino, che applicando il protocollo "tradizionale" tendeva a disgregarsi e a distaccarsi dal vetrino. Il giusto compromesso è stato trovato riducendo il tempo di trattamento termico a 20 minuti e la temperatura a 100°C, condizioni a seguito della cui applicazione si è generalmente osservato un adeguato livello di preservazione morfologica dei campioni tissutali in esame

In ogni singola prova sono stati utilizzati adeguati campioni tissutali di controllo, rappresentati da sezioni di *obex* e da sezioni ileali con i relativi plessi nervosi mienterici e sottomucosi e con le relative placche del Peyer di ovini positivi. I controlli negativi sono stati rappresentati, invece, sia dai medesimi campioni di cui sopra, previa omissione dell'anticorpo primario, sia da analoghe sezioni di tessuto nervoso ed ileale ottenute da animali non infetti.

### 2.2.2 Immunofluorescenza indiretta

Per le indagini di immunofluorescenza indiretta sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-*prion protein* (PrP, clone F99/97.6.1 MoAb, 1:200; VMRD, Inc., USA) anti-*neuronal Nitric Oxide Synthase* (nNOS, 1:40; BD Transduction Laboratories), anti-*Calbindin* (CALB 1:1000; Swant), anti-*Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP, 1:400; Chemicon), anti-*Human Neuronal C/D Protein* (Hu C/D, clone 16A11, 1:500; Molecular Probes), anti-*Human Neuronal Specific Enolase* (NSE, clone BBS/NC/VI-H14, 1:500; Dako).

Il protocollo applicato, pressoché sovrapponibile a quello adottato per le indagini immunoistochimiche, variava solo per l'omissione dell'inibizione delle perossidasi endogene e per l'utilizzo di appropriati anticorpi secondari "capra anti-topo" (*goat anti-mouse*) coniugati con il fluorocromo Alexa 594 (Molecular Probs) alla diluizione di 1:200 e "capra anti-coniglio" (*goat anti-rabbit*) coniugato con il fluorocromo isotiocianato di fluoresceina (FITC, Calbiochem) alla diluizione di 1:50. Gli anticorpi secondari sono stati scelti in relazione all'anticorpo primario utilizzato; talvolta il protocollo ha previsto l'utilizzo contemporaneo di più anticorpi secondari, nel caso delle indagini di colocalizzazione per l'immunomarcatura di CALB e nNOS, in cui sono stati usati contemporaneamente "marker" pan-neuronali (anticorpi anti-Hu C/D o anti-NSE) al fine di valutare la percentuale dei neuroni immunomarcati sul totale.

La fase di incubazione con l'anticorpo primario ha previsto, per entrambe le metodiche, di cui sopra, una pre-incubazione con siero normale di cavallo per ridurre i legami aspecifici.

### 2.2.3 Whole-mount

La metodica “*Whole-mount*” (*WM*), che consente di ottenere preparati tissutali caratterizzati da una cellularità ben più elevata rispetto alle normali sezioni istologiche e di studiarli al contempo secondo una proiezione quasi “tridimensionale”, è stata eseguita, in pieno accordo con quanto recentemente pubblicato sull’argomento (Chiocchetti *et al.*, 2004), presso i laboratori del Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università degli Studi di Bologna.

Più in particolare segmenti ileali (ileo distale) di 6-8 cm di lunghezza, (circa 2 cm anteriormente alla valvola ileo-ciecale), sono stati prelevati, prontamente immersi in PBS (0,9% NaCl in 0,01 M tampone sodio fosfato, pH 7,0) e sezionati lungo il margine mesenterico; i suddetti campioni sono stati vigorosamente risciacquati a temperatura ambiente, distesi con spilli da entomologia su tavolette di legno di balsa (con la superficie della mucosa rivolta verso il basso) e fissati in liquido di Zamboni (paraformaldeide al 2%, acido picrico 0,2% in tampone PBS 0,1M, pH 7,0, per essere processati ed immunomarcati (nei confronti dei “*marker*” sopra elencati) in linea con quanto previsto dal succitato protocollo (Chiocchetti *et al.*, 2004) ed osservati infine, al microscopio a fluorescenza.

#### 2.2.4 Western Blot

La metodica “*Western blot*” (WB) è stata effettuata presso il Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale dell’Istituto Superiore di Sanità di Roma.

Il tessuto cerebrale (in corrispondenza dell’*obex*), nonché alcuni distretti di LRS (ivi comprese le placche del Peyer, *Peyer’s patches*, *PPs*), tutti precedentemente congelati, sono stati inizialmente omogenizzati in una soluzione tampone contenente Tris/HCl (100mM, pH 7,4) con il 2% di Sarcosyl per essere quindi sottoposti a digestione enzimatica con proteinasi K per 1 h a 37°C. Dopo centrifugazione, i campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi seguita dal “*blotting*” su membrana in PVDF(Millipore).

Infine, la reazione immunologica è stata evidenziata mediante l’utilizzo di uno specifico anticorpo monoclonale anti-PrP (P4, R-Biopharm) e di un anticorpo secondario di “cavallo anti-topo” (*horse anti-mouse*) coniugato con perossidasi.



## 2.3 RISULTATI

I 46 ovini oggetto di studio, tutti inclusi in un Progetto di Ricerca Strategico a carattere nazionale coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, erano costituiti, come già esposto in precedenza, da 41 animali di razza Sarda infettati *per os* all'età di 8 mesi con un ceppo di Scrapie precedentemente caratterizzato nel topo e da 5 soggetti di controllo della medesima razza non infettati.

Per quanto concerne i risultati ottenuti mediante l'utilizzo di appropriate tecniche immunoistochimiche e di immunofluorescenza indiretta finalizzate all'evidenziazione della PrP<sup>Sc</sup> nei tessuti oggetto di studio, 13 dei 41 succitati ovini (10 dei quali portatori del genotipo ARQ/ARQ, 3 dei quali portatori del genotipo ARQ/AHQ), sono risultati positivi a livello sia delle PPs, sia dei plessi dell'ENS e più in particolare, a proposito di questi ultimi, a livello sia dei plessi mienterici (MPs) che dei plessi sottomucosi (SMPs) residenti nel segmento ileale (Tabella 5).

Dei 13 animali risultati positivi, 8 pecore clinicamente sane con genotipo ARQ/ARQ sono state sacrificate a 12-24 mesi p.i., mentre i rimanenti 5 ovini, tutti clinicamente affetti (2 dei quali con genotipo ARQ/ARQ, 3 con genotipo ARQ/AHQ), sono stati sacrificati rispettivamente a 24 e 36 mesi p.i.

Le indagini immunoistochimiche ed in immunofluorescenza indiretta, supportate da quelle in WB (Foto 1), hanno permesso di mettere in evidenza la presenza di PrP<sup>Sc</sup> sia a livello dell'*obex* (Foto 2-4), sia in sede enterica e, più in particolare, in corrispondenza del segmento ileale. In tali distretti, più o meno consistenti depositi di PrP<sup>Sc</sup> erano dimostrabili a livello sia delle PPs loco-regionali (Foto 5, 6), sia di MPs (Foto 7-9) e, seppure in minor misura, anche di SMPs (Foto 8).

Il *pattern* di distribuzione dell'immunoreattività nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> in tutti i suddetti animali, sia asintomatici che sintomatici, non risultava uniforme in termini sia qualitativi, sia quantitativi, dal momento che ad una prevalente modalità di deposito in sede perineuronale, ritenuta a sua volta pienamente compatibile con il coinvolgimento della componente enterogliale (Foto 10), si associava in alcuni casi la contestuale presenza di aggregati di PrP<sup>Sc</sup> all'interno di singoli corpi neuronali.

I succitati accumuli di PrP<sup>Sc</sup> si caratterizzavano, inoltre, per la presenza di un *pattern* di deposizione "granulare", in guisa di "granuli di pepe" ("*pepper granule-like*" *deposition pattern*), risultando altresì ben più consistenti a livello di MPs, così come negli animali clinicamente affetti rispetto a quelli asintomatici.

## 2.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio ha consentito di dimostrare il precoce accumulo di PrP<sup>Sc</sup> che si viene a realizzare, a livello sia delle PPs, sia dei plessi dell'ENS di ovini di razza Sarda recanti i genotipi sensibili ARQ/ARQ e ARQ/AHQ, come conseguenza dell'infezione sperimentale effettuata *per os* mediante un ceppo di Scrapie precedentemente caratterizzato in un idoneo modello murino. Tale evenienza, anche da noi documentata in epoca antecedente rispetto alla comparsa della sintomatologia clinica, annette ulteriore credito alla già pur robusta ipotesi relativa al cruciale ruolo patogenetico svolto dall'ENS nella c.d. "neuroinvasione" (Andréoletti *et al.*, 2000; McBride *et al.*, 2001; van Keulen *et al.*, 2002; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006; Mabbott e MacPherson, 2006). A tal proposito, anche nella razza Sarda è stato parimenti documentato il fondamentale ruolo svolto dal genotipo dell'ospite, ed in particolare dal codone 171 del gene *Prnp*, nel modulare la suscettibilità/resistenza dell'ospite nei confronti della malattia, per cui gli animali portatori del genotipo ARQ/ARQ risulteranno essere quelli maggiormente sensibili nei confronti della Scrapie (Vaccari *et al.*, 2001; Agrimi *et al.*, 2003; Ligios *et al.*, 2005).

Dai risultati del nostro studio si evince altresì, verosimilmente, lo strategico ruolo patogenetico esplicito dalle EGCs residenti a livello dei plessi dell'ENS nella cinetica di accumulo della PrP<sup>Sc</sup> in corso d'infezione sperimentale *per os* sostenuta dall'agente della Scrapie in ovini di razza Sarda.

Questo dato, anch'esso in accordo con le indicazioni desunte dalla bibliografia esistente in materia (Andréoletti *et al.*, 2000; Sigurdson *et al.*, 2001), offre a considerare tutta una serie di analogie rispetto a quanto

si realizza in ambito di SNC, ove è stato ormai definitivamente accertato il fondamentale ruolo patogenetico svolto in corso di TSE dalle cellule astrogliali (Liberski e Brown, 2004), che rappresentano appunto l'esatto corrispettivo morfo-funzionale delle EGCs popolanti i plessi dell'ENS e che al pari delle prime svolgono, come ben noto, un importante ruolo trofico e protettivo nei confronti delle diverse popolazioni neuronali ivi residenti (Cabarrocas *et al.*, 2003).

Per quanto concerne, infine, le indagini effettuate sui preparati WM ottenuti dagli ovini oggetto di studio, a loro volta finalizzate a dimostrare l'esistenza di eventuali oscillazioni numeriche nelle diverse popolazioni cellulari residenti a livello dei plessi dell'ENS in corso d'infezione sperimentale realizzata *per os*, si ritiene parimenti opportuno sottolineare che tali indagini sarebbero state ampiamente giustificate da quanto già diffusamente documentato a livello del SNC, ove in corso di qualsivoglia TSE umana ed animale si assisterebbe pressoché costantemente ad una più o meno ingente perdita neuronale (Pocchiari, 1994; Prusiner, 1998; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006).

Si ribadisce, a tal proposito, che si è ritenuto opportuno avvalersi della metodica WM, dal momento che la stessa garantisce, rispetto alle "tradizionali" sezioni istologiche, l'indubbio vantaggio di consentire l'osservazione dei preparati di tessuto intestinale (ileale, nello specifico) secondo una prospettiva "tridimensionale", con una ben più consistente cellularità dei campioni tissutali oggetto di studio, costituiti nella fattispecie da preparazioni distinte di MPs e di SMPs.

Purtroppo, a fronte di quanto sopra esposto, la qualità non ottimale del materiale biologico di partenza, almeno per quel che concerne questo particolare tipo di esigenza, non ci ha permesso di affrontare nella maniera dovuta la pur rilevante questione relativa alla valutazione di

eventuali differenze numeriche esistenti nell'ambito delle diverse popolazioni cellulari residenti a livello dei plessi dell'ENS fra ovini infetti, da un lato, ed animali di controllo, dall'altro.

In conclusione, il presente studio ci ha consentito di ottenere una serie di valide informazioni volte a supportare, da un lato, il fondamentale ruolo esplicito dall'ENS nella patogenesi della Scrapie sperimentale in ovini di razza Sarda e, dall'altro lato, di confermare l'altrettanto cruciale ruolo esplicito dal genotipo dell'ospite nel modularne la suscettibilità/resistenza nei confronti dell'infezione, con il conseguente ottenimento di una chiara conferma in merito al già documentato ruolo-chiave svolto dai genotipi "sensibili" ARQ/ARQ e ARQ/AHQ ai fini della progressione dell'infezione.

## **ICONOGRAFIA**

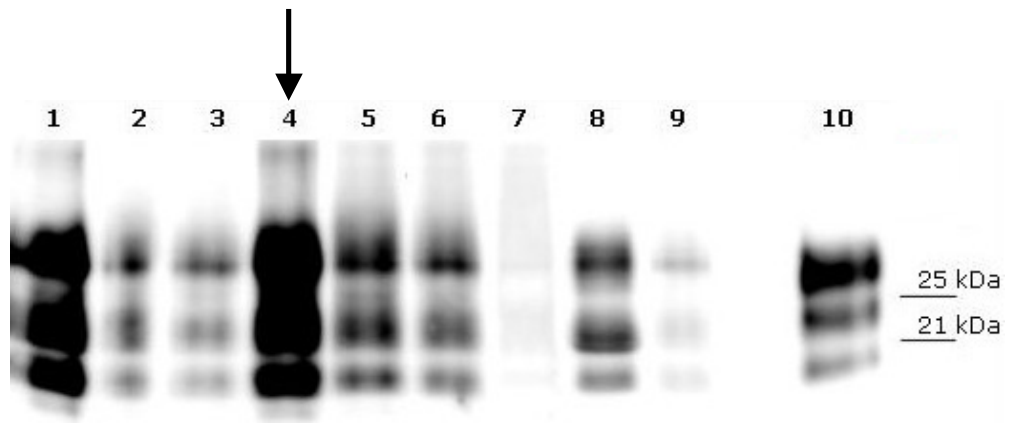


FOTO 1

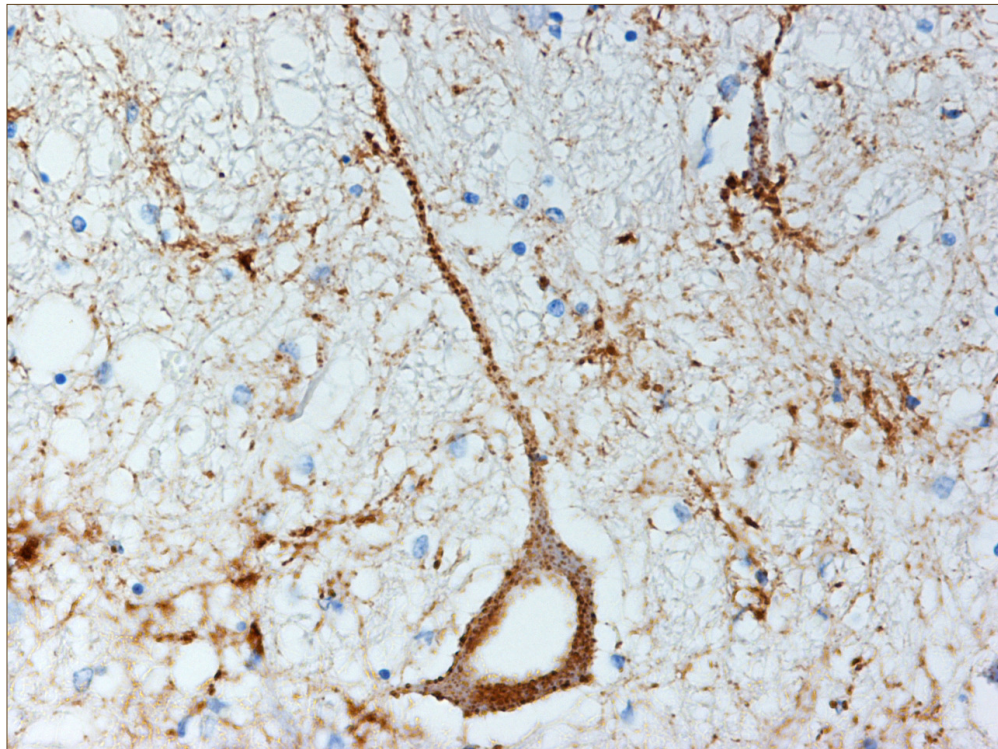


FOTO 2

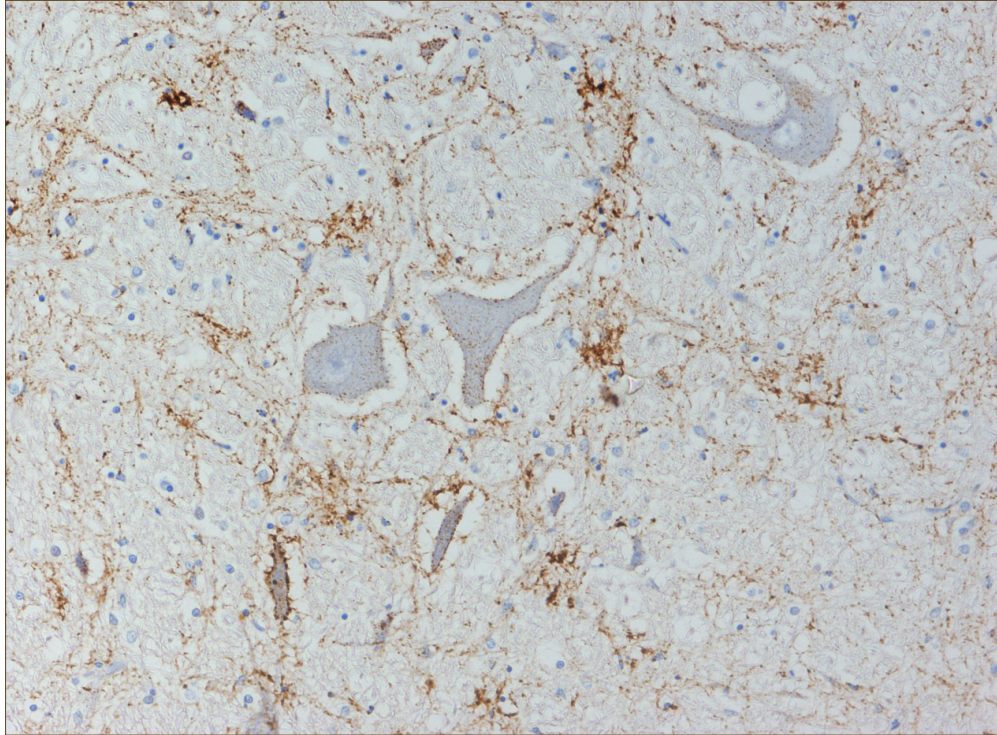


FOTO 3

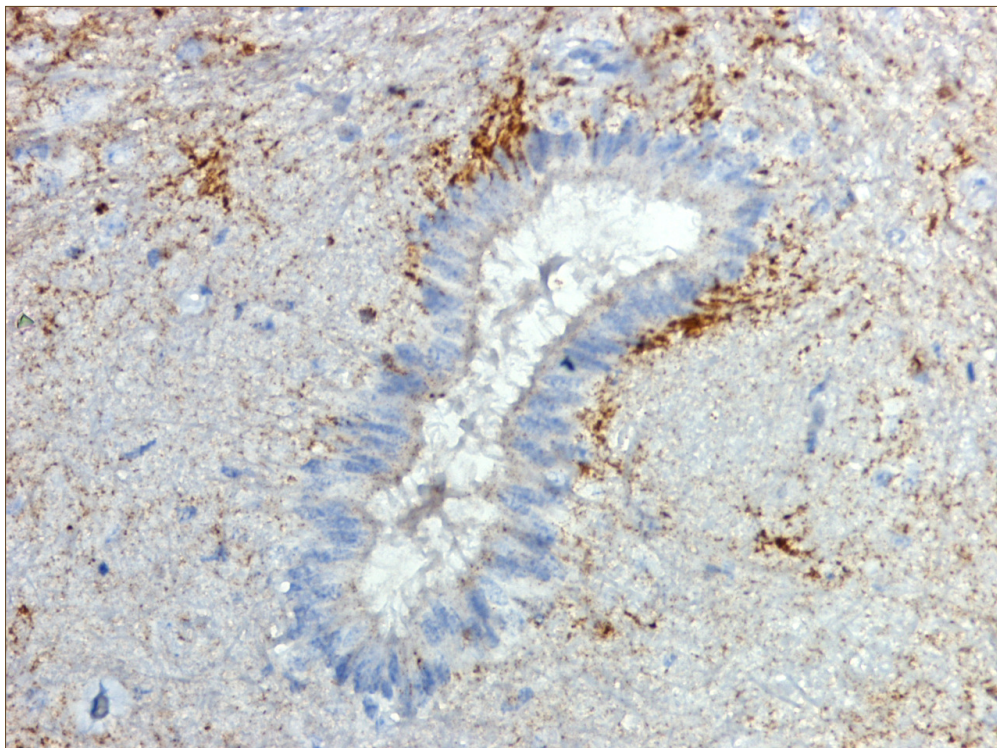


FOTO 4



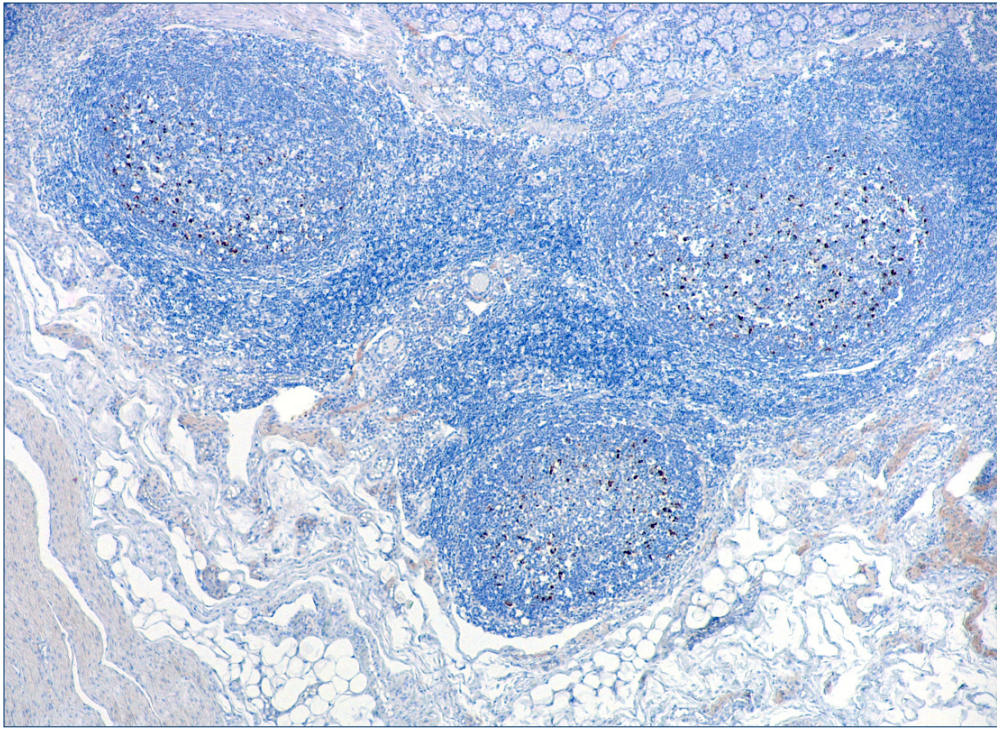


FOTO 5

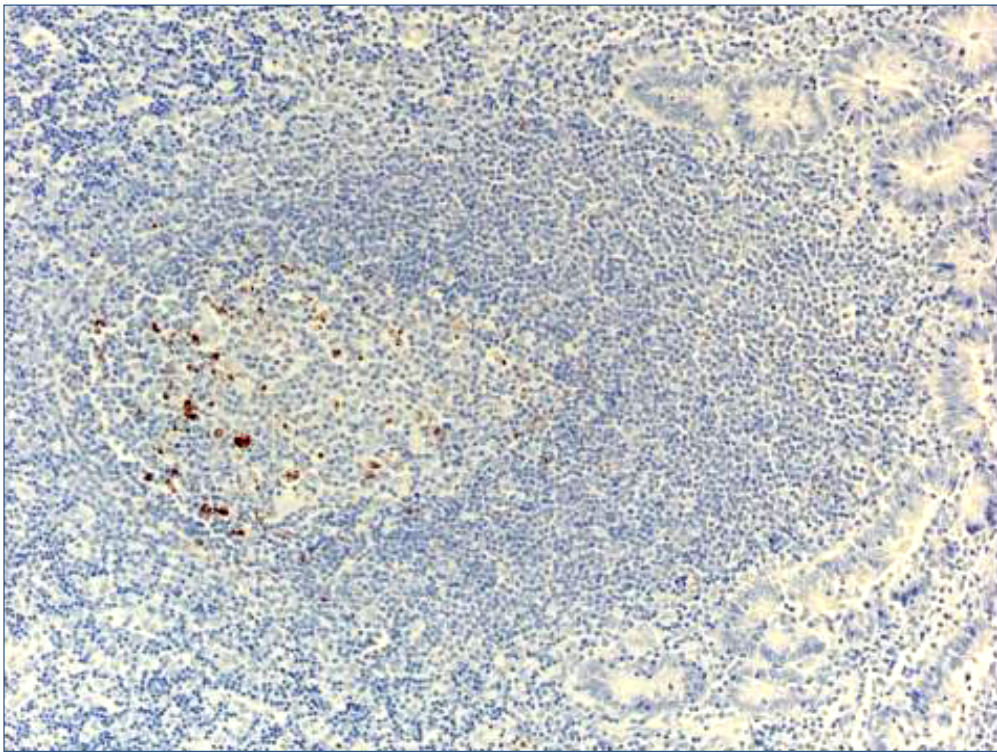


FOTO 6

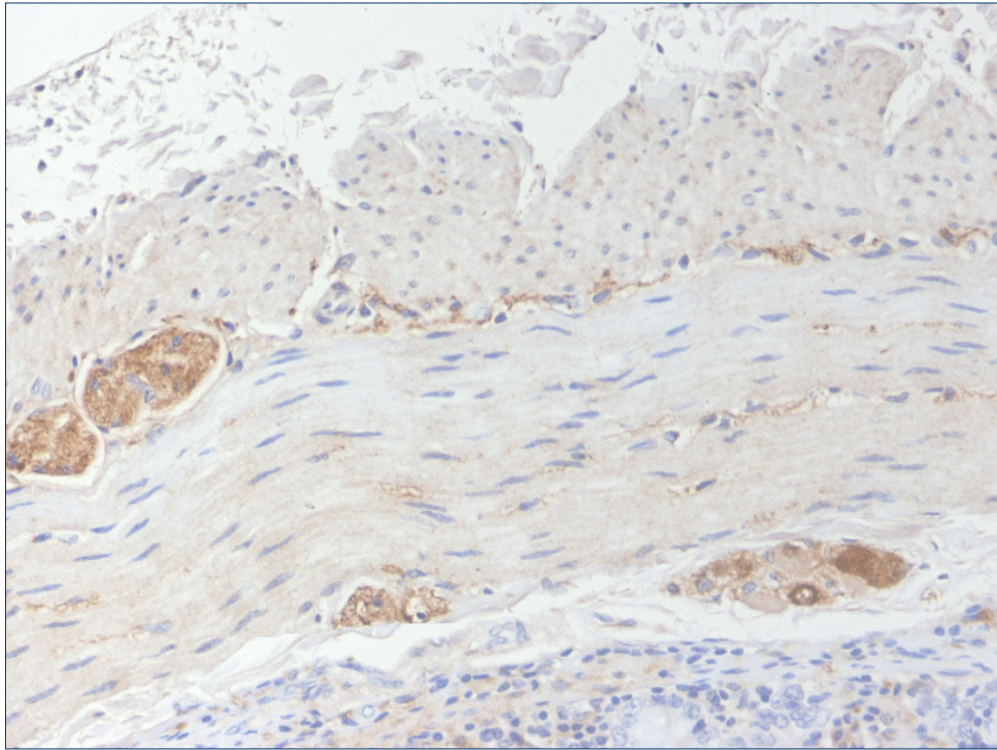


FOTO 7

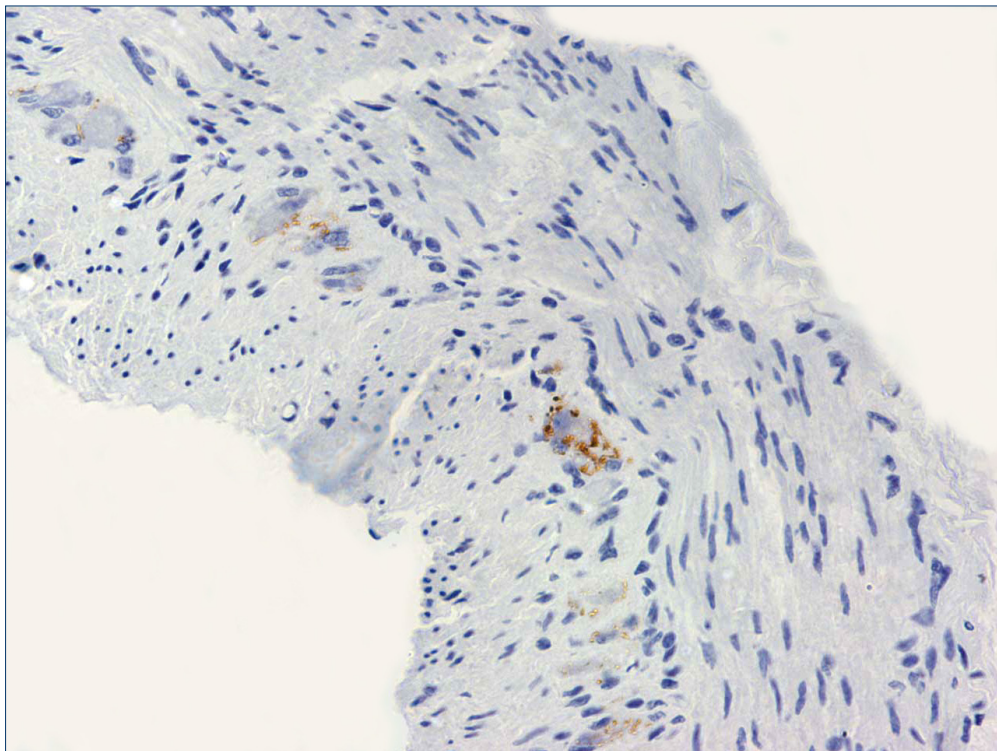


FOTO 8

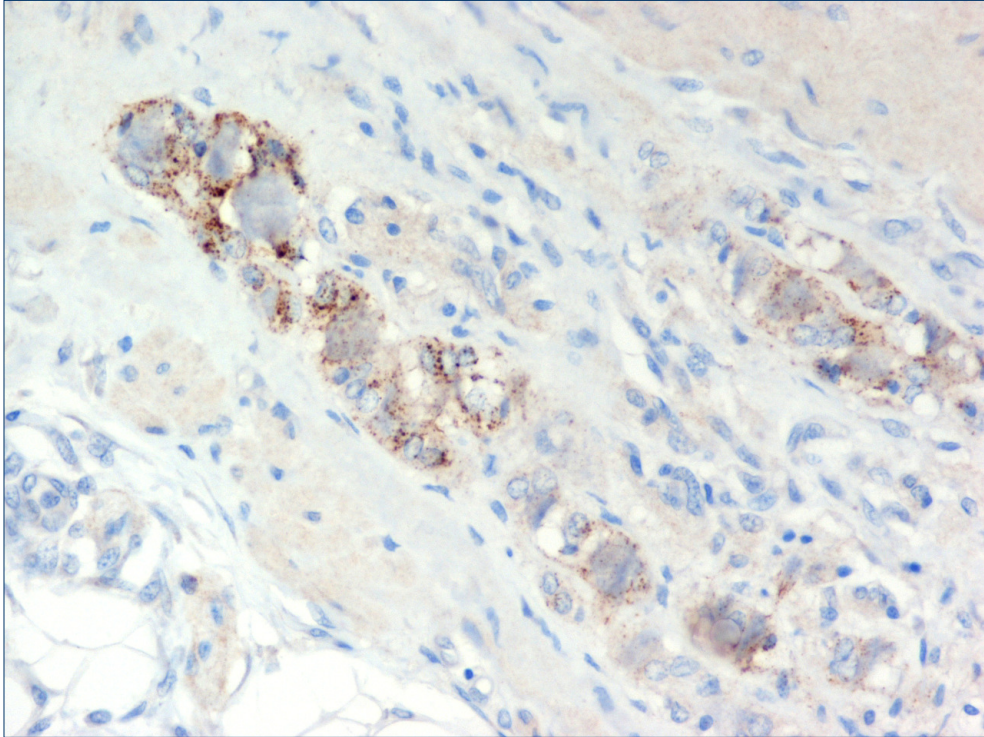


FOTO 9

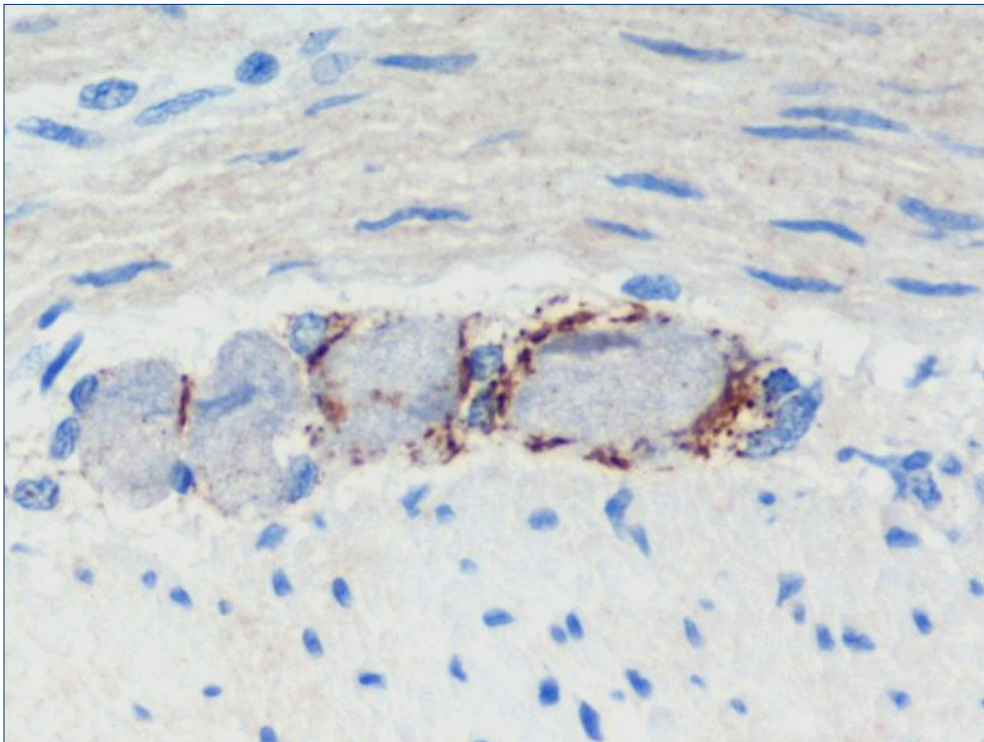


FOTO 10

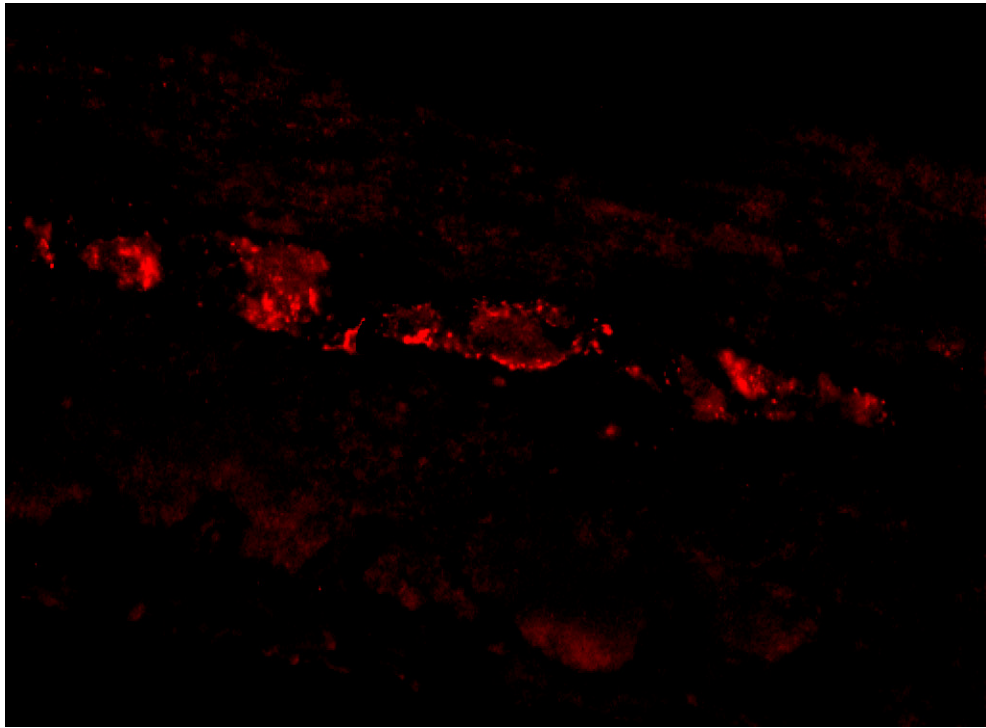


FOTO 11

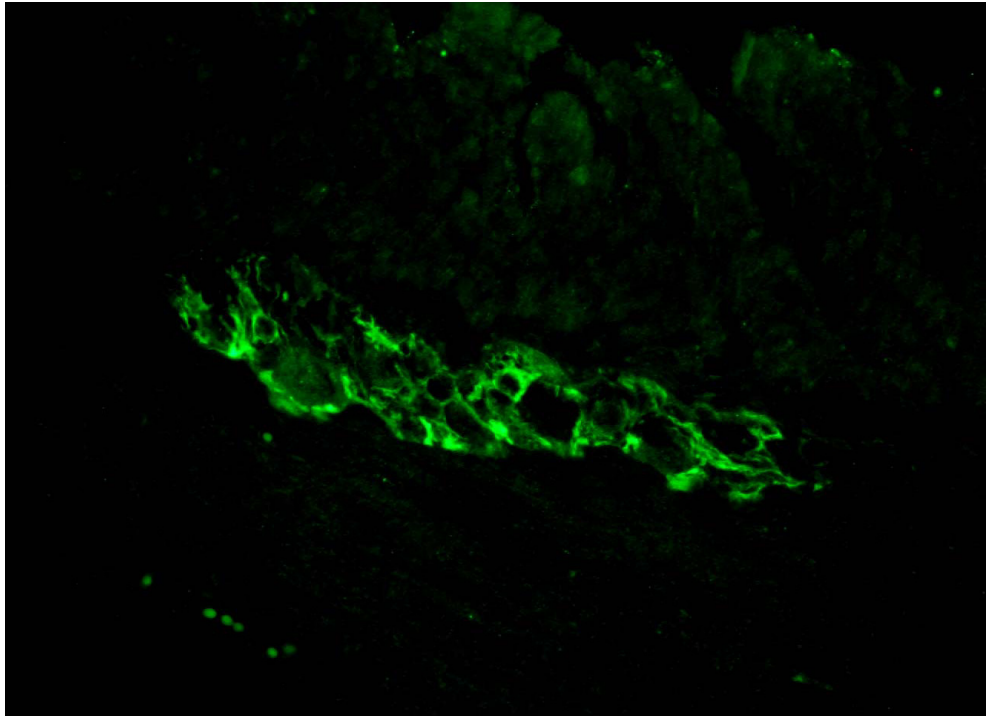


FOTO 12

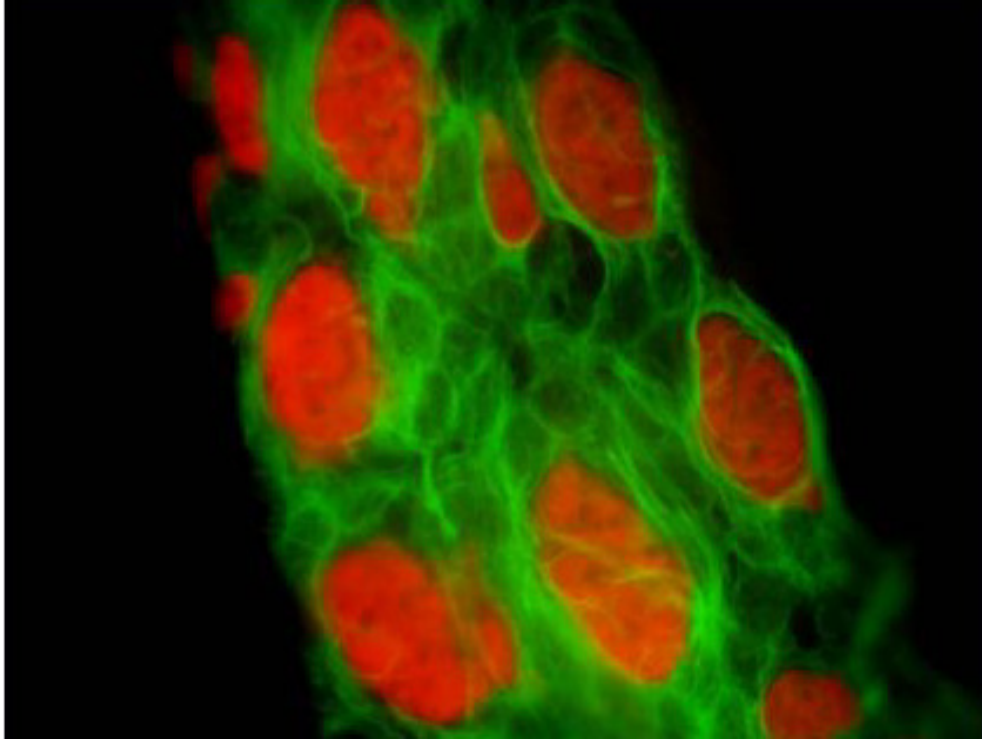


FOTO 13

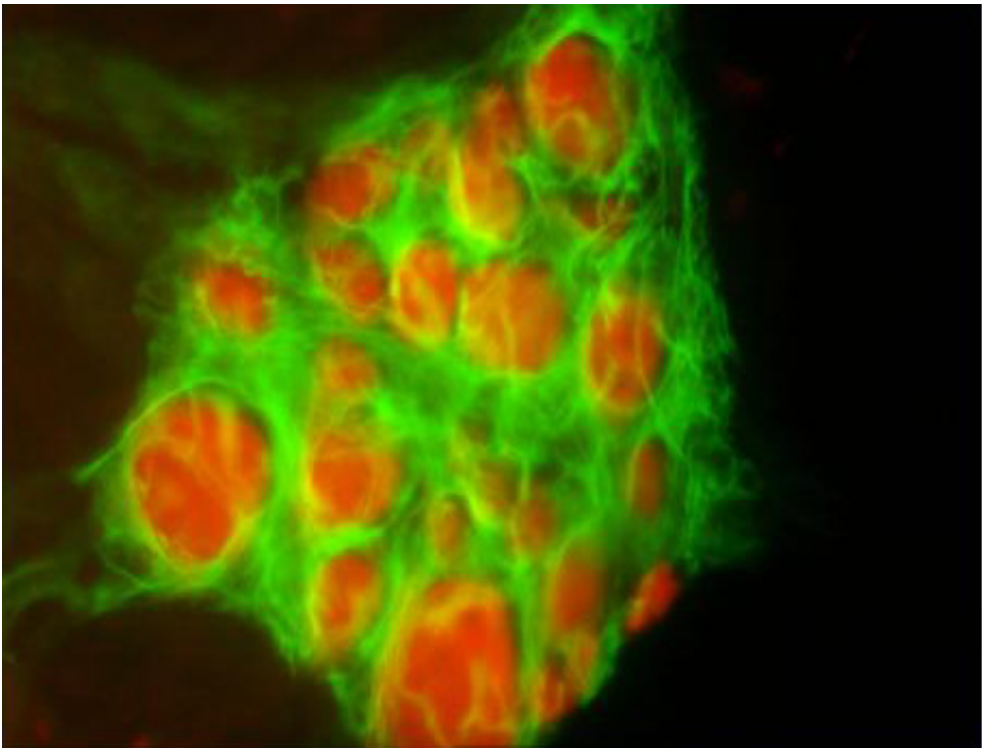


FOTO 14

## Legende foto

**Foto 1:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ, infettato *per os* e sottoposto ad eutanasia a 16 mesi p.i. Corsia 1) tonsilla palatina; Corsia 2) linfonodo retrofaringeo; Corsia 3) linfonodo mandibolare; Corsia 4) PP digiunale; Corsia 5) linfonodo mesenterico (digiunale); Corsia 6) linfonodo mesenterico (ileale); Corsia 7) linfonodo mesenterico (duodenale); Corsia 8) milza; Corsia 9) linfonodo mediastinico; Corsia 10) *obex* di un ovino di controllo. Corsie 1-9: 40 mg di tessuto; Corsia 10: 0,4 mg di tessuto. Anticorpo utilizzato: P4MoAb. (Immagine a cura di Romolo Nonno, Istituto Superiore di Sanità).

**Foto 2:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Encefalo (*obex*). Presenza di consistenti aggregati di PrP<sup>Sc</sup>, con un prevalente *pattern* di deposizione di tipo “lineare” o “sinaptico”. Immunoistochimica (IHC) nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo dell’anticorpo monoclonale (MoAb) F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 20X.

**Foto 3:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Encefalo (*obex*). Presenza di consistenti aggregati di PrP<sup>Sc</sup> a livello del neuropilo ed in sede peri-endoneuronale. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 20X.

**Foto 4:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Encefalo (*obex*). Presenza di consistenti aggregati di PrP<sup>Sc</sup> in sede peri- e sub-ependimale. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup>

mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 40X.

**Foto 5:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. PPs digiunali. Presenza di evidenti depositi di PrP<sup>Sc</sup> all'interno dei follicoli linfatici. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 10X.

**Foto 6:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. PPs digiunali. Particolare dell'immagine precedente. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 40X.

**Foto 7:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Ileo. Presenza di consistenti depositi di PrP<sup>Sc</sup> a livello sia di MPs che di SMPs. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 10X.

**Foto 8:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Ileo. Presenza di aggregati di PrP<sup>Sc</sup> a livello di MPs. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 10X.

**Foto 9:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Ileo. Presenza di consistenti depositi di PrP<sup>Sc</sup> a

livello di MPs. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 20X.

**Foto 10:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Ileo. Presenza di aggregati di PrP<sup>Sc</sup> a livello di un singolo MP, con un *pattern* di deposizione compatibile con il coinvolgimento delle EGCs. IHC nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, 40X (Immagine a cura di Giuseppe Marruchella, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo).

**Foto 11:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Ileo. Presenza di consistenti depositi di PrP<sup>Sc</sup> a livello di MPs, con un *pattern* di deposizione compatibile con il coinvolgimento delle EGCs (vedi immagine successiva). Immunofluorescenza (IF) indiretta nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> mediante utilizzo del MoAb F99. Fluorocromo impiegato: Alexa 594; 20X (Immagine a cura di Giuseppe Marruchella, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo).

**Foto 12:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Ileo (MP). IF indiretta nei confronti della GFAP, “*marker*” specifico delle EGCs, mediante utilizzo di un appropriato anticorpo anti-GFAP. Il *pattern* di reazione osservato mostra numerose analogie con quello descritto nell’immagine precedente, il che rende oltremodo plausibile il coinvolgimento delle EGCs nella cinetica di accumulo della PrP<sup>Sc</sup> a livello dei plessi dell’ENS. Fluorocromo impiegato: Isotiocianato di fluoresceina (FITC 492); 20X (Immagine a



cura di Giuseppe Marruchella, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo).

**Foto 13:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Animale di controllo. Ileo (MP). Preparato allestito secondo la tecnica WM. IF indiretta nei confronti della GFAP, “*marker*” specifico delle EGCs, nonché del “*marker*” pan-neuronale Hu C/D. Grazie all’applicazione di questa metodica vengono chiaramente evidenziati gli intimi rapporti di connessione esistenti fra EGCs (colorate in verde), da un lato, e neuroni residenti a livello dei plessi dell’ENS (colorati in rosso), dall’altro. Fluorocromi impiegati: FITC 492 (verde), Alexa 594 (rosso); (Immagine a cura di Roberto Chiocchetti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna).

**Foto14:** Ovino di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ. Scrapie sperimentale *per os*. Ileo (MP). Preparato allestito secondo la tecnica WM. IF indiretta nei confronti della GFAP, “*marker*” specifico delle EGCs, nonché del “*marker*” pan-neuronale Hu C/D. Grazie all’applicazione di questa metodica vengono chiaramente evidenziati gli intimi rapporti di connessione esistenti fra EGCs (colorate in verde), da un lato, e neuroni residenti a livello dei plessi dell’ENS (colorati in rosso), dall’altro, senza che si possano peraltro apprezzare sensibili variazioni di IR nei confronti dei due succitati “*markers*” rispetto all’immagine precedente. Fluorocromi impiegati: FITC 492 (verde), Alexa 594 (rosso); (Immagine a cura di Roberto Chiocchetti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna).

**BIBLIOGRAFIA CITATA E CONSULTATA**

1. Acín C., Martín-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzon M., Smith A., Rodellar C., Badiola J.J., Zaragoza P. (2004): **Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep**; *J Gen Virol*, 85: 2103-2110.
2. Agrimi U, Conte M, Morelli L, Di Bari MA, Di Guardo G, Ligios C, Antonucci G, Aufiero GM, Pozzato N, Mutinelli F, Nonno R, Vaccari G.(2003): **Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics**; *Vet Res Commun*, 27:31-38.
3. Aguzzi A., Heikenwalder M. (2003): **Cannibals and garbage piles**; *Nature*, 423: 127.
4. Aguzzi A., Heikenwalder M. (2006): **Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook**; *Nat Rev Microbiol*, 4: 765-775.
5. Aguzzi A., Polymenidou M. (2004): **Mammalian prion biology: one century of evolving concepts**; *Cell*, 116: 313-327.
6. Andréoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Grosclaude J., van Keulen L., Schelder F., Elsen J.M., Lantier F. (2000): **Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural Scrapie**; *J Gen Virol*, 81: 3115-3126.
7. Andréoletti O., Simon S., Lacroux C., Morel N., Tabouret G., Chabert A., Lugan S., Corbiere F., Ferre P., Foucras G., Laude H., Eychenne F., Grassi J., Schelcher F. (2004): **PrP<sup>Sc</sup> accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie**; *Nat Med*, 10:591-593.

8. Appel T.R., Lucassen R., Groschup M.H., Joncic M., Beekes M., Riesner D. (2006): **Acid inactivation of prions: efficient at elevated temperature or acid concentration**; J Gen Virol, 87: 1385-1394.
9. Archer F., Bachelin C., Andreoletti O., Besnard N., Perrot G., Langevin C., Le Dur A., Vilette D., Baron-Van Evercooren A., Vilotte J.L., Laudel H. (2004): **Cultured Peripheral Neuroglial Cells Are Highly Permissive to Sheep Prion Infection**; J Virol, 78: 482–490.
10. Aube A.C., Cabarrocas J., Neunlist M., Liblau R.S., Galmiche J.P. (2003): **Neuronal plasticity induced in the enteric nervous system by immune targeting of glia in transgenic mice**; Gastroenterology, 124: A74.
11. Balemba O.B., Mbassa G.K., semuguruda W.D., Assey R.L., Kahwa C.K.B., Hay-Schmidt A., Dantzer V. (1999): **The topography, architecture and structure of the enteric nervous system in the jejunum and ileum of cattle**; J Anat, 195: 1-9.
12. Bär K.J., Facer P., Williams N.S., Tam P.K., Anand P. (1997): **Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprungs's disease**; Gastroenterology, 112: 1381-1385.
13. Bartz J.C., DeJoia C., Tucker T., Kincaid A.E., Bessen R.A. (2005): **Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection**; J Virol, 79: 11858-11863.

14. Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M.A., Bratberg B. (2003): Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98; *Vet Rec*, 153: 202-208.
15. Beekes M., McBride P.A., Baldauf E. (1998): **Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie**; *J Gen Virol*, 79: 601-607.
16. Beekes M., McBride P.A. (2000): **Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie**; *Neurosci Lett*, 278:181-184.
17. Belt P.B.G.M., Muileman I.H., Schreuder B.E.C., Ruijter J.B., Gielkens A.L.J., Smits M.A.(1995): **Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie**; *J Gen Virol*, 76: 509-517.
18. Belichenko P.V., Miklossy J., Belser B., Budka H., Celio M.R. (1999): **Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease**; *Neurobiol Dis*, 6: 269-279.
19. Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. (1982): **Identification of a protein that purifies with the scrapie prion**; *Science*, 218: 1309-1311.
20. Borchelt D.R., Sott M., Taraboulos A., Sthal N., Prusiner S.B. (1990): **Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells**; *J Cell Biol*, 110: 743-752.

21. Bouissin F., Jaegly A., Deslys J.P., Dormont D. (1994): **A simple and rapid method for sequencing the entire coding region of the human prion protein (PrP) gene;** J Neurosci Methods, 54: 103-107.
22. Brown D.R., Qin K., Herms J.W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P.E., Kruck T., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D., Kretzschmar H. (1997): **The cellular prion protein binds copper in vivo;** Nature, 390: 684-687.
23. Brown D.R. (2004): **Metallic prions;** Biochem Soc Symp, 71: 193-202.
24. Bruce M.E., McConnell I., Fraser H., Dickinson A.G. (1991): **The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis;** J Gen Virol, 72: 595-603.
25. Bruce M., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C.J. (1997): **Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent;** Nature, 389: 498-501.
26. Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M., Weissmann C. (1993): **Mice devoid of PrP are resistant to scrapie;** Cell, 73: 1339-1347.
27. Burns A.J., Douarin N.M. (1998): **The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut:**

**spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system;** *Development*, 125: 4335-4347.

28. Burns A.J., Pasricha P.J., Young H.M. (2004): **Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential;** *Neurogastroenterol Motil*, Suppl 1: 3-7.
29. Bush T.G., Savidge T.C., Freeman T.C., Cox H.J., Campbell E.A., Mucke L., Johnson M.H., Sofroniew M.V. (1998): **Fulminant jejuno-ileitis following ablation of the enteric glia in adult transgenic mice;** *Cell*, 93: 189-201.
30. Cabarrocas J., Savidge T.C., Liblau R.S. (2003): **Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease;** *Glia*, 41: 81-93.
31. Casalone C., Zanusso G., Acutis P., Ferrari S., Capucci L., Tagliavini F., Monaco S., Caramelli M. (2004): **Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease;** *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3065-3070.
32. Casalone C., Corona C., Crescio M.I., Martucci F., Mazza M., Ru G., Bozzetta E., Acutis P.L., Caramelli M. (2005): **Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring Scrapie;** *J Virol*, 79: 5847-5849.
33. Chacon M.A., Barria M.I., Lorca R., Huidobro-Toro J.P., Inestrosa N.C. (2003): **A human prion protein peptide (PrP(59-91)) protects against copper neurotoxicity;** *Mol Psychiatry*, 8: 853-862.

34. Chalazonitis A. (2004): **Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system**; Prog Brain Res, 146: 243-263.
35. Chiesa R., Piccardo P., Dossena S., Nowoslawski L., Roth K.A., Ghetti B., Harris D.A. (2005): **Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease**; PNAS, 102: 238-243.
36. Chiocchetti R., Grandis A., Bombardi C., Clavenzani P., Lalatta Costerbosa G., Lucchi M.L., Furness J.B. (2004): **Characterisation of neurons expressing calbindin immunoreactivity in the ileum of unweaned and mature sheep**; Cell Tissue Res, 318: 289-303.
37. Cloucard C., Beaudry P., Elsen J.M., Milan D., Dussaucy C., Bounneau C., Schelcher F., Chatelain J., Launay J.M., Laplanche J.L. (1995): **Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie**; J Gen Virol, 76: 2097-2101.
38. Cravero G., Guarda F., Dotta U., Guglielmino L. (1977): **La scrapie in pecore di razza biellese. Prima segnalazione in Italia**; La Clinica Veterinaria, 100: 1-14.
39. Dickinson A.G., Stamp J.T., Renwick C.C. (1974): **Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep**; J Comp Pathol, 84: 19-25.
40. Di Guardo G., Agrimi U. (1993): **Apoptosis and subacute spongiform encephalopathies**; Res Virol, 144: 409-410.



41. Di Guardo G., Marcato P.S. (2002): **Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili**; In: Marcato PS “Patologia Sistemica Veterinaria”, Bologna, Edagricole-II Sole 24 Ore, 1302-1311.
42. Di Guardo G., Malatesta D., Marà M., Petrucci L, Lalatta Costerbosa G., Chiocchetti R., Clavenzani P., Bortolami R., Agrimi U., D’Agostino C., Vaccari G., Ligios C., De Grossi L., Rosone F., Marruchella G. **Pathogenetic studies on the enteric nervous system of sarda breed sheep with different PrP genotypes following oral experimental scrapie infection.** PRION 2005 Between fundamentals and society’s needs. Dusseldorf (Germany), 19-21 Ottobre 2005.
43. Di Guardo G., De Grossi L., Malatesta D., Marà M., Petrucci L, Lalatta Costerbosa G., Chiocchetti R., Clavenzani P., Mazzoni M., Albanese V., Agrimi U., D’Agostino C., Vaccari G., Nonno R., Ligios C.,, Rosone F., Pifferi R., Marruchella G. **Pathological findings in ileal enteric nervous system plexuses of sarda breed sheep with different PrP genotypes following oral experimental scarpie infection.** Atti del XXIst International Winter Meeting on Growth and Death in the Nervous System, 22-26 Marzo 2006.
44. Elsen J.M., Aigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andreoletti O., Eychenne F., Ttien Khang J.V., Poivey J.P., Lantier F., Laplanche J.L. (1999): **Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie. Detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov**; Arch Virol, 144: 431-445.
45. Ersdal C., Ulvund M.J., Espens A., Benestad S.L., Sarradin P., Landsverk T. (2005): **Mapping PrP<sup>Sc</sup> propagation in experimental and natural Scrapie with different PrP genotypes**; Vet Pathol, 42: 258-274.

46. Everest S.J., Thorne L., Barnicle D.A., Edwards J.C., Elliott H., Jackman R., Hope J. (2006): **Atypical prion protein in sheep brain collected during the british scrapie-surveillance programme**; J Gen Virol, 87: 471-477.
47. Ferri G.L., Probert L., Cocchia D., Michetti F., Marangos P.I., Polak J.M. (1982): **Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system**; Nature, 297: 409-410.
48. Furness J.B., Sanger G.J. (2002): **Intrinsic nerve circuit of the gastrointestinal tract**; Current Op Pharmacol, 2: 612-622.
49. Furness J.B. (2003): **Intestinofugal neurons and sympathetic reflexes that bypass the central nervous system**; J Comp Neurol, 455: 281-284.
50. Gabella G. (1981): **Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells**; Neuroscience, 6: 425-436.
51. Galligan J.J., LePard K.J., Schneider D.A., Zhou X. (2000): **Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system**; J Auton Nerv Syst, 81: 97-103.
52. German D.C., Ng M.C., Liang C.L., McMahon A., Iacopino A.M. (1997): **Calbindin-D28k in nerve cell nuclei**; Neuroscience, 81: 735-743.

53. Gershon M.D., Bursztajn S. (1978): **Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa;** J Comp Neurol, 180: 467-488.
54. Gershon M.D., Rothman T.P. (1991): **Enteric glia;** Glia, 4: 195-204.
55. Gershon M.D., Kirchgessner A.L., Wade P.R. (1994): **Functional anatomy of the enteric nervous system. In Physiology of the Gastrointestinal Tract;** 3<sup>rd</sup> ed, vol 1, Johnson L.R. et al (Eds). Raven press, New York, pp 381-422.
56. Giese A., Kretschmar H.A. (2001): **Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies;** Curr Top Microbiol Immunol, 253: 203-217.
57. Glatzel M., Heppner F.L., Albers K.M., Aguzzi A. (2001): **Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion;** Neuron, 31: 25-34.
58. Goldmann W., Hunter N., Smith G., Foster J., Hope J. (1994): **PrP genotypes and the Sip gene in Cheviot sheep form the basis for scrapie strain typing in sheep;** Ann N Y Acad Sci, 724: 296-299.
59. González L., Martin S., Jeffrey M. (2003): **Distinct profiles of PrP<sup>d</sup> immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing;** J Gen Virol, 84: 1339-1350.

60. González L., Jeffrey M., Sisò S., Martin S., Bellworthy S.J., Stack M.J., Chaplin M.J., Davis L., Dagleish M.P., Reid H.W. (2005): **Diagnosis of preclinical scrapie in sample of rectal mucosa**; Vet Rec, 25: 846-847.
61. González L., Terry L., Jeffrey M. (2005): **Expression of prion protein in the gut of mice infected orally with thw 301V murine strain of the Bovine Spongiform Encephalopathy agent**; J Comp Pathol, 132: 273-282.
62. González L., Dagleish M.P., Bellworthy S.J., Sisò S., Stack M.J., Chaplin L.A., Hawkins S.A.C., Hughes J., Jeffrey M. (2006): **Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa**; Vet Rec, 158: 325-331.
63. González L., Sisò S., Martin S., Jeffrey M. (2006): **Immunoistochemical phenotypes of natural and experimental sheep TSEs**; Proceedings of 24<sup>th</sup> Meeting of European Society of Veterinary Pathology, Edinburg, Scotland.
64. Gossner A., Hunter N., Hopkins J. (2006): **Role of lymph-borne cells in the early stages of scrapie agent dissemination from the skin**; Vet Immunol Immunopathol, 109: 267-278.
65. Griffith J.S. (1967): **Self-replication and scrapie**; Nature, 215: 1043-1044.

66. Grundy D., Schemann M. (2005): **Enteric nervous system**; *Curr Opin Gastroenterol*, 21: 176-182.
67. Haik S., Faucheux B.A., Sazdovitch V., Privat N., Kemeny J.L., Perret-Liadet A., Hauw J.J. (2003): **The sympathetic nervous system in variant Creutzfeldt-Jakob disease**; *Nat Med*, 9: 1121-1123.
68. Hamir A.H., Miller J.M., Cutlip R.C. (2004): **Failure to detect prion protein (PrP<sup>res</sup>) by immunohistochemistry in striated muscle tissues of animals experimentally inoculated with agents of transmissible spongiform encephalopathy**; *Vet Pathol*, 41: 78-81.
69. Heggebø R., Press C.M., Gunnes G., Lie K.I., Tranulis M.A., Ulvund M., Groschup M.H., Landsverk T. (2000): **Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of Scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the Scrapie agent**; *J Gen Virol*, 81: 2327-2337.
70. Heggebø R., González L., Press C.M., Gunnes G., Espens A., Jeffrey M. (2003): **Disease-associated PrP in the enteric nervous system of Scrapie affected Suffolk sheep**; *J Gen Virol*, 84: 1327-1338.
71. Heikenwalder M., Zeller N., Seeger H., Prinz M., Klön P.C., Schawarz P., Ruddle N.H., Weissmann C., Aguzzi A. (2005): **Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions**; *Science*, 307: 1107-1110.

72. Heppner F.L., Christ A.D., Klein M.A., Prinz M., Freid M., Kraehenbuhl J.P., Aguzzi A.(2001): **Transepithelial prion transport by M cells**; Nature Med, 7: 976-977.
73. Hermann L.M., Cheevers W.P., Davis W.C., Knowles D.P., O'Rourke K.I. (2003): **CD21-positive follicular dendritic cells. A possible source of PrP<sup>Sc</sup> in Lymph node macrophages of Scrapie-infected sheep**; Am J Pathol, 162: 1075-1081.
74. Herz L. (1965): **Possible Role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal-neuroglial-neuronal impulse transmission system**; Nature, 206: 1091-1904.
75. Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Slide K.C., Gowland I., Collinge J., Doey L.J., Lantos P. (1997): **The same prion strain causes vCJD and BSE**; Nature, 389: 448-450.
76. Houston F., Goldmann W., Chong A., Jeffrey M., Gonzalez L., Foster J., Parnham D., Hunter N. (2003): **BSE in sheep bred for resistance to infection**; Nature, 423: 498.
77. Hunter N., Goldmann W., Foster J.D., Cairns D., Smith G.(1974): **Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep**; Vet Rec, 141: 137-140.
78. Hunter N., Cairns D. (1998): **Scrapie-free Merino and Pool Dorset sheep from Australia and New Zeland have normal frequencies of scrapie susceptible PrP genotypes**; J Gen Virol, 79: 2079-2082.

79. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. (2002): **Transmission of prion diseases by blood transfusion**; J Gen Virol, 83:2897-2905.
80. Ikeda T., Horiuchi M., Ishiguro N., Muramatsu Y., Kai-Uwe G.D., Shinagawa M. (1995): **Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan**; J Gen Virol, 76: 2577-2581.
81. Jeffrey M., González L., Espenes A., Press C.McL., Martin S., Chaplin M., Davis L., Landsverk T., MacAldowie C., Eaton S., McGoven G. (2006): **Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep**; J Pathol, 209: 4-14.
82. Kapur R.P., Gershon M.D., Milla P.J., Pachnis V. (2004): **The influence of Hox genes and three intercellular signalling pathways on enteric neuromuscular development**; Neurogastroenterol Motil, Suppl 1: 8-13.
83. Kennedy A.L., Mawe G.M. (1998): **Duodenal sensory neurons project to sphincter of Oddi ganglia in guinea pig**; J Neurosci, 18: 8065-8073.
84. Kimberlin R.H., Field H.J., Walker C.A. (1983): **Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system**; J Gen Virol, 64: 713-716.

85. King C.Y., Diaz-Avalos R. (2004): **Protein-only transmission of three yeast prion strains**; Nature, 428: 319-323.
86. Kirby L, Goldmann W, Houston F, Gill AC, Manson JC. (2006): **A novel, resistance-linked ovine PrP variant and its equivalent mouse variant modulate the in vitro cell-free conversion of rPrP to PrP(res)**; J Gen Virol, 87: 3747-3751.
87. Klein M.A., Frigg R., Flechsig E., Raeber A.J., Kalinke U., Bluethmann H., Bootz F., Suter M., Zinkernagel R.M., Aguzzi A. (1997): **A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie**; Nature, 390: 687-690.
88. Klingerborn M., Wik L., Simonsson M., Renström L.H.M., Ottinger T., Linnè T. (2006): **Characterization of proteinase k-resistant N- and C-terminally truncated PrP in Nor98 atypical Scrapie**; J Gen Virol, 87: 1751-1760.
89. Kovács G., Preusser M., Strohschneider M., Budka H. (2005): **Subcellular localization of disease-associated prion protein in the human brain**; Am J Pathol, 166: 287-294.
90. Komuro T., Baluk P., Burnstock G. (1982): **An ultrastructural study of nerve profiles in the myenteric plexus of the rabbit colon**; Neuroscience, 7: 295-305.
91. Kunzi V., Glatzel M., Nakano M.Y., Greber U.F., Van Leuven F., Aguzzi A. (2002): **Unhampered prion neuroinvasion despite impaired fast axonal transport in transgenic mice overexpressing**



**four-repeat tau;** J Neurosci, 22: 7471-7477.

92. Lalatta-Costerbosa G., Mazzoni M., Clavenzani P., Di Guardo G., Mazzuoli G., Marruchella G., De Grossi L., Agrimi U., Chiocchetti R. (2007): **NOS-immunoreactivity and NADPH-d Histochemistry in the Enteric Nervous System of Sarda Breed Sheep With Different PrP Genotypes in Wholemout and Cryostat Preparations;** J Histochem Cytochem, Jan 8 (in press).
93. Lasmezás C.I., Cesbron J.Y., Deslys J.P., Demaimay R., Adjou K.T., Rioux R., Lemaire C., Loch C., Dormont D. (1996): **Immune system-dependent and -independent replication of the Scrapie agent;** J Virol, 70: 1292-1295.
94. Le Dur A., Beringue V., Andréoletti O., Reine F., Lan Lai T., Baron T., Bratberg B., Villotte J.L., Sarradin P., Benestad S., Laude H. (2005): **A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes;** PNAS, 102: 16031-16036.
95. Legname G., Baskakov I.V., Nguyen H.O., Riesner D., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (2004): **Synthetic mammalian prions;** Science, 305: 673-676.
96. Liang J., Pan Y.L., Ning X.X., Sun L.J., Lan M., Hong L., Du J.P., Liu N., Liu C.J., Qiao T.D., Fan D.M. (2006): **Overexpression of PrP<sup>C</sup> and its antiapoptosis function in gastric cancer;** Tumour Biol, 27: 84-91.

97. Li A., Harris D.A.( 2005): **Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast**; J Biol Chem, 280: 17430-17434.
98. Ligios C., Bandino E., Di Guardo G., Ferrari G.C., Perfetti M.G., Eleni C., Ru G., Miceli G., Spanu G.P., Agrimi U., Pocchiari M. (1999): **Scrapie della pecora: Osservazioni cliniche ed epidemiologiche in pecore di razza Sarda**; O&DV, 1: 65-70.
99. Ligios C., Sigurdson C.J., Santucci C., Carcassola G., Manco G., Basagli M., Maestrone C., Cancedda M.G., Madau L., Aguzzi A. (2005): **PrP<sup>Sc</sup> in mammary gland of sheep affected by Scrapie and mastitis**; Nat Med, 11: 1137-1138.
100. Ligios C., Cancedda M.G., Madau L., Santucci C., Maestrone C., Agrimi U., Ru G., Di Guardo G. (2006): **PrP(Sc) deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie**; Arch Virol, 151: 2007-2020.
101. Lincoln J., Hoyle C.H.V., Burnstock G. (1997): **Nitric oxide in health and disease**; 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press.
102. Mabbott N.A., Bruce M.E. (2001): **The immunobiology of TSE diseases**; J Gen Virol, 82: 2307-2318.
103. Mabbott N.A., Bruce M.E., Botto M., Walport M.J., Pepys M.B. (2001): **Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie**; Nat Med, 7: 485-487.

104. Mabbott N.A., Bruce M.E. (2001): **The immunobiology of TSE diseases**; J Gen Virol, 82: 2307-2318.
105. Mabbott N.A., Bruce M.E. (2002): **Follicular dendritic cells as targets for intervention in transmissible spongiform encephalopathies**. Seminars in Immunology, 14: 285-293.
106. Mabbott N.A., McGovern G., Jeffrey M., Bruce M.E. (2002): **Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain**; J Virol, 76: 5131-5139.
107. Mabbott N.A., Young J., McConnell I., Bruce M.E. (2003): **Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility**; J Virol, 77: 6845-6854.
108. Mabbott N.A., MacPherson G.G. (2006): **Prions and their lethal journey to the brain**; Nature Rev Microbiol, 4: 201-211.
109. Maignien T., Lasmezas C.I., Beringue V., Dormont D., Deslys J.P. (1999): **Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents**; J Gen Virol, 1999 80: 3035-3042.
110. Marcos Z., Pfeifer K., Bodegas M.E., Sesma M.P., Guembe L. (2004): **Cellular prion protein is expressed in a subset of neuroendocrine cells of the rat gastrointestinal tract**; J Histochem Cytochem, 52: 1357-1365.

111. Martin S., González L., Chong A., Houston F.E., Hunter N., Jeffrey M. (2005): **Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with Bovine Spongiform Encephalopathy**; J Gen Virol, 86: 839-848.
112. Masters C.L., Richardson E.P. (1978): **Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change**; Brain, 101: 333-344.
113. Mathiason C.K., Powers J.G., Dahmes S.J., Osborn D.A., Miller K.V., Warren R.J., Mason G.L., Hays S.A., Hayes-Klug J., Seelig D.M., Wild M.A., Wolfe L.L., Spraker T.R., Miller M.W., Sigurdson C.J., Telling G.C., Hoover E.A. (2006): **Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease**; Science, 314: 133-136.
114. McBride P.A., Schulz-Schaeffer W.J., Donaldson M., Bruce M., Diringer H., Kretzschmar H.A., Beekes M. (2001): **Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves**; J Virol, 75: 9320-9327.
115. McGoven G., Brown K.L., Bruce M.E. Jeffrey M. (2004): **Murine Scrapie infection causes an abnormal germinal centre reaction in the spleen**; J Comp Pathol, 130: 181-194.
116. McMillin D.L., Richards D.G., Mein E.A., Nelson C.D. (1999): **The abdominal brain and enteric nervous system**; J Altern and Complementary Medicine, 5: 575.

117. Montrasio F., Frigg R., Glatzel M., Klein M.A., Mackay F., Aguzzi A., Weissmann C. (2000): **Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells**; *Science*, 288: 1257-1259.
118. Montrasio F., Cozzio A., Flechsing E., Rossi D., Klein M.A., Rüllicke T., Raeber A.J., Vosshenrich C.A.J., Proft J., Aguzzi A., Weissmann C. (2001): **B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion prion knockout mice**; *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4034-4037.
119. Morel E., Andrieu T., Casagrande F., Gauczynski S., Weiss S., Grassi J., Rousset M., Dormont D., Chambaz J. (2005): **Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor**; *Am J Pathol*, 167:1033-1042.
120. Nagahama M., Semba R., Tsuzuki M., Aoki E. (2001): **L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum**; *Biol Signals Recept*, 10: 336-340.
121. Neunlist M., Toumi F., Oreschkova T., Denis M., Leborgne J., Laboisse C.L., Galmiche J.P., Jarry A. (2003): **Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways**; *Am J Physiol gastrointest Liver Physiol*, 285: 1028-1036.
122. Neutra M.R., Frey A., Kraehenbuhl J.P. (1996): **Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization**; *Cell*, 86: 345-348.

123. Pan Y., Zhao L., Liang J., Liu J., Shi Y., Liu N., Zhang G., Jin H., Gao J., Xie H., Wang J., Liu Z., Fan D. (2006): **Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer;** FASEB J, 20: 1886-1888.
124. Pattison I.H., Hoare M.N., Jebbett J.N., Watson W.A. (1972): **Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep;** Vet Rec, 90: 465-468.
125. Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N. & Watson, W. A. (1974): **Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep;** Brit Vet J, 130: 65-67.
126. Pauly P.C., Harris D.A.(1998): **Copper stimulates endocytosis of the prion protein;** J Biol Chem, 273: 33107-33110.
127. Pocchiari M. (1994): **Prions and related neurological diseases;** Mol Aspects Med, 15: 195-291.
128. Prado M.A.M., Alves-Silva J., Magalhães A.C., Prado V.F., Linden R., Martins V.R., Brentani R.R. (2004): **PrP<sup>c</sup> on the road: trafficking of the cellular prion protein;** J Neurochem, 88: 769-781.
129. Prinz M., Montrasio M., Klein M.A., Schwarz P., Odermatt B., Pfeffer K., Aguzzi A. (2002): **Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells;** PNAS, 99: 919-924.

130. Prinz M., Huber G., Macpherson A.J.S., Heppner F.L., Glatzel M., Eugster H.P., Wagner N., Aguzzi A. (2003): **Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's Patches but not of enteric lymphocytes**; Am J Pathol, 162: 1103-1111.
131. Prusiner S.B. (1991): **Molecular biology of prion diseases**; Science, 252: 1515-1522.
132. Prusiner S.B. (1982): **Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie**; Science, 216: 136-144.
133. Prusiner S.B. (2001): **Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions**; N Engl J Med, 344: 1516-1526.
134. Prusiner S.B.(1998): **Prions**; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 13363-13383.
135. Raeber A.J., Klein M.A., Frigg R., Flechsig E., Aguzzi A., Weissmann C. (1999): **Prp-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice**; EMBO J, 18: 2702-2706.
136. Race R., Oldstone M., Chesebro B. (2000): **Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal Scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen**; J Virol, 74: 828-833.
137. Razaie P., Lantos P.L. (2001): **Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies**; Brain Res Brain Res Rev, 35: 55-72.

138. Rühl A., Trotter J., Stremmel W.(2001): **Isolation of enteric glia and establishment of trasformed enterogial cell lines from the myenteric plexus of adult rat**; Neurogastroenterol Motil, 13: 95-106.
139. Rühl A. (2005): **Glial cells in the gut**; Neurogastroenterol Motil, 17: 777-790.
140. Russelakis-Cameiro M., Hetz C., Maundrell K., Soto C. (2004): **Prion replication alters the distibution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts**; Am J Pathol, 165: 1839-1848.
141. Ryder S.J., Wells G.A.H., Bradshaw J.M., Pearson G.R. (2001): **Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy**; Vet Rec, 148: 437-441.
142. Sakudo A., Lee D.C., Yoshimura E., Nagasaka S., Nitta K., Saeki K., Matsumoto Y., Lehmann S., Itohara S., Sakaguchi S., Onodera T. (2004): **Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions**; Biochem Biophys Res Commun 313: 850-855.
143. Schiltz E., Scharfenstein M., Breing B. (2006): **Genotyping of ovine prion protein gene (PRNP) variants by PCR with melting curve analysis**; Clin Chem, 52: 1-4.
144. Schreuder B.E., van Keulen L.J., Vromans M.E., Langeveld J.P., Smits M.A. (1996): **Preclinical test for prion diseases**; Nature, 381: 563.



145. Schuler K.L., Jenks J.A., DePerno C.S., Wild M.A., Swanson C.C. (2005): **Tonsillar biopsy test for Chronic Wasting Disease: two sampling approaches in mule deer white-tailed deer**; *J Wild Dis*, 41: 820-824.
146. Seeger H., Heikenwalder M., Zeller N., Kranisch J., Schwarz P., Gaspert A., Seifert B., Miele G., Aguzzi A. (2005): **Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion**; *Science*, 310: 324-326.
147. Sigurdson C.J., Williams E.S., Miller M.W., Spraker T.R., O'Rourke K.L., Hoover E.A. (1999): **Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*)**; *J Gen Virol*, 80: 2757-2764.
148. Sigurdson C.J., Spraker T.R., Miller M.W., Oesch B., Hoover E.A. (2001): **PrP (CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease**; *J Gen Virol*, 82: 2327-2334.
149. Song Z.M., Brookes S.J., Costa M. (1994): **All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine**; *Neurosci Lett*, 180: 219-222.
150. Sorenson J.R. (2001): **Prion diseases: copper deficiency states associated with impaired nitrogen monoxide or carbon monoxide transduction and translocation**; *J Inorg Biochem*, 87:125-127.

151. Sparkes R.S., Simon M., Cohn V.H., Fournier R.E., Lem J., Klisak I., Heinzmann C., Blatt C., Lucero M., Mohandas T. (1986): **Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes**; Proc Natl Acad Sci U S A, 83: 7358-7562.
152. Stach W. (1982): **[Neuronal organization of the plexus myentericus (Auerbach) in the small intestine of the pig. IV. Type IV-Neurons]**; Z Mikrosk Anat Forsch, 96: 972-94.
153. Steele A.D., Emsley J.G., Ozdinler P.H., Lindquist S., Macklis J.D.(2006): **Prion protein (PrP<sup>C</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis**; Proc Natl Acad Sci, 103: 3416-3421.
154. Sthal N., Prusiner S.B. (1991): **Prions and prion proteins**; FASEB J, 5: 2799-2807.
155. St Rose S.G., Hunter N., Matthews L., Foster D., Chase-Topping M.E., Kruuk L.E.B., Shaw D.J., Rhind S.M. Will R.G., Woolhouse M.E.J. (2006): **Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies**; BMC Infectious Disease, 6: 5.
156. Taylor D.M., McConnel I., Fraser H. (1996): **Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice**; J Gen Virol, 77: 1595-1599.

157. Tanaka M., Chien P., Naber N., Cooke R., Weissman J.S. (2004): **Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences**; Nature, 428: 319-323.
158. Tessitore V. (1998): **The nitroxidergic neuron in central and peripheral nervous system and related paraneural structures**; Ital J Anat Embriol, 103: 13-52.
159. Timmermans J.P., Scheurmann D.W., Stach W., Adriaensen D., De Groodt-Lasseel M.H.A. (1992): **Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals**; Eur j Morphol, 30: 113-122.
160. Tongue S.C., Pfeiffer D.U., Warner R., Elliott H., Del Rio Vilas V. (2006): **Estimation of the relative risk of developing clinical scrapie: the role of prion protein (PrP) genotype and selection bias**; Vet Rec, 158: 43-50.
161. Vaccari G., Petraroli R., Agrimi U., Eleni C., Perfetti M.G., Di Bari M.A., Morelli L., Ligios C., Butani L., Nonno R., Di Guardo G. (2001): **PrP genotype sarda breed sheep and its relevance to Scrapie**; Arch Virol, 146: 2029-2037.
162. van Keulen L.J.M., Schreuder B.E.C., Meloen R.H., Mooij-Harkes G., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M. (1996): **Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural Scrapie**; J Clin Microbiol, 34: 1228-1231.

163. van Keulen L.J.M., Schreuder B.E.C., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M., Smits M.A. (1999): **Scrapie-associated Prion Protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural Scrapie**; J Comp Pathol, 121: 55-63.
164. van Keulen L.J.M., Schreuder B.E.C., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M., Smits M.A. (2000): **Pathogenesis of natural Scrapie in sheep**; Arch Virol Suppl, 16: 57-71.
165. van Keulen L.J.M., Vromans M.E.W., van Zijderveld F.G. (2002): **Early and late pathogenesis of natural Scrapie infection in sheep**; APMIS, 110: 23-32.
166. Vassallo N., Herms J. (2003): **Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse**; J Neurochem, 86: 538-544.
167. Vidal E., Bolea R., Tortosa R., Costa C., Domenech A., Monleon E., Vargas A., Badiola J.J., Pumarola M. (2006): **Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains**; J Virol Methods, 136:137-146.
168. von Boyen G., Steinkamp M. (2006): **The enteric glia and neurothropic factors**; Z Gastroenterol, 44: 985-990.
169. Waggoner D.W., Xu J., Singh I., Jasinska R., Zhang Q.X., Brindley D.N. (1999): **Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction**; Biochim Biophys Acta, 1439: 299-316.

170. Ward SM, Xue C, Shuttleworth CW, Bredt DS, Snyder SH, Sanders KM. (1992): **NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon;** Am J Physiol, 263: G277-284.
171. Watson J.D., Crick F.H. (1953): **Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid;** Nature, 171: 964-967.
172. Weissmann C. (1999): **Molecular genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies;** J Biol Chem, 274: 3-6.
173. Wells G.A.H, Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R. (1987): **A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle;** Vet Rec, 121: 419-420.
174. Westaway D., Zuliani V., Cooper C.M., Da Costa M., Neuman S., Jenny A.L., Detwiler L., Prusiner S.B.(1994): **Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptibility to natural scrapie;** Gen & Develop, 8: 959-969.
175. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Cousens S.N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., Smith P.G. (1996): **A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK;** The Lancet, 347: 921-925.
176. Wood J.D. (1994): **Physiology of the enteric nervous system;** In: Johnson LR, ed. Physiology of the gastrointestinal tract, 3<sup>rd</sup> edn. New York: Raven Press, 423–482.

177. Wopfner F., Weidenhöfer G., Schneider R., von Brunn A., Gilch S., Schwarz T.F., Werner T., Schätzi H.M. (1999): **Analysis of 27 mammalian and 9 Avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein**; J Mol Biol, 289: 1163-1178.
178. Wrathall A.E. (1997): **Risks of transmitting scrapie and bovine spongiform encephalopathy by semen and embryos**; Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties), 16: 240-264.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio *in primis* il Prof. Giovanni Di Guardo per la sua disponibilità e per il suo preziosissimo aiuto, senza il quale questo lavoro non sarebbe stato possibile.

Ringrazio il Prof. Leonardo Della Salda che sin dai tempi della tesi di laurea mi ha sempre sostenuto e guidato nello studio dell'Anatomia Patologica e nella Ricerca; lo ringrazio soprattutto per aver riposto fiducia in me.

Un grazie speciale va senza dubbio alle mie Colleghe Laura e Mariarita, con cui ho condiviso questi lunghi tre anni, per la loro disponibilità ed il loro immenso aiuto che mi hanno sempre offerto anche durante la stesura di questa tesi; un pensiero di gratitudine per Chiara e per il personale tecnico, in particolare per Marco che ho spesso tediato con i miei mille problemi al computer.

Ringrazio Luigi Petrucci per la sua disponibilità da studente, che non mi ha mai negato, neanche nella condivisione delle lunghe ore trascorse in laboratorio.

Ringrazio, inoltre, il Dott. Giuseppe Marruchella per le immagini fornite. La presente ricerca è stata eseguita mediante l'utilizzo di fondi appositamente erogati dal Ministero per l'Istruzione, l'Università e la Ricerca (MIUR, fondi PRIN 2004) e dalle Università degli Studi di Teramo e di Bologna, nonché dalla Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna, Istituzioni ed Enti che riteniamo doveroso ringraziare sentitamente in relazione a quanto sopra.

Un altrettanto sentito e doveroso ringraziamento va parimenti rivolto alla Prof.ssa Giovanna Lalatta-Costerbosa ed agli altri Colleghi del Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università Degli Studi di Bologna, nonché ai Colleghi Dott. Umberto Agrimi (Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma) e Dott. Luigi De Grossi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Viterbo), senza la cui preziosa collaborazione ed il cui fondamentale apporto il presente studio non sarebbe stato possibile.