

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Mediche veterinarie**

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H1

Settore Scientifico disciplinare: VET/01

**DENSITA' E DISTRIBUZIONE DELLE CELLULE DI PURKINJE
NEL CERVELLETO DI CANE: STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO**

Presentata da: Dott.ssa Alessia Ruffini

Coordinatore Dottorato

Prof. Carlo Tamanini

Relatore

Prof. Roberto Chiocchetti

Correlatore

Prof. Gualtiero Gandini

Esame finale anno 2016

Riassunto

Gli studi morfologici e morfometrici presenti in letteratura sul cervelletto degli animali e dell'uomo evidenziano come una struttura così grande e complessa sia stata spesso studiata parzialmente, valutando il numero delle cellule del Purkinje (CP) solo in alcuni campi scelti random. Gli studi quantitativi, tesi soprattutto alla quantificazione del numero delle CP, sono stati quasi sempre condotti su cervelletti fissati in formalina e inclusi in paraffina, mentre sono molto rari gli studi eseguiti su campioni congelati. Inoltre, negli studi riportati in letteratura, i preparati sono valutati in seguito a colorazione classica con ematossilina-eosina (E&E) o in seguito a reazione immunoenzimatica (DAB).

In questo studio si è voluto quantificare, su sezioni (criosezioni e sezioni incluse in paraffina) sagittali dell'intero verme cerebellare di cane sottoposte a colorazione classica e reazioni di immunistochemica, il numero e la distribuzione delle CP. Sono stati inoltre valutati lo spessore dello strato dei granuli e dello strato molecolare.

Sono stati analizzati 8 cervelletti prelevati da pazienti afferiti all'Ospedale Veterinario Didattico "Giuseppe Gentile" e sottoposti ad eutanasia per gravi problematiche mediche. L'età di tutti i pazienti presi in esame variava dai 2 mesi ai 16 anni con netta prevalenza di soggetti anziani. Tutti i campioni sono stati fissati in paraformaldeide 4% per 48 h a +4°C. Successivamente il verme del cervelletto è stato diviso sul piano mediano in due parti. Una metà è stata preparata per il congelamento in isopentano raffreddato in azoto liquido per stoccarla a -80 °C, mentre l'altra metà è stata stoccata a +4 °C. Da questi campioni sono state ottenute delle sezioni sagittali su cui sono state eseguite reazioni di immunofluorescenza indiretta e immunoenzimatica (DAB), utilizzando l'anticorpo policlonale anti-calbindina (28 kDa; Swant). I vetrini così ottenuti sono stati esaminati al microscopio a fluorescenza e tramite la funzione mosaico è stata ricostruita la totalità della sezione su cui è stata poi effettuata la conta manuale di tutte le CP lungo tutte le lamelle di ciascun lobulo, per la totalità dei lobi cerebellari di tutti i campioni. Per la valutazione degli spessori degli strati della corteccia, sono state eseguite diverse misurazioni, su apice, base e tratto lungo di ciascuna lamina. Su sezioni adiacenti sono state eseguite colorazioni istologiche con ematossilina-eosina al fine di poter evidenziare l'integrità del tessuto e la qualità del preparato nel suo insieme.

Nella normale corteccia cerebellare si è evidenziata un'intensa immunoreattività alla calbindina (CALB-IR) di tutte le CP che ha consentito di marcare anche tutti i loro processi dendritici arborizzati nello strato molecolare. L'osservazione di tutti i lobuli nella loro completezza ha evidenziato, nei soggetti anziani, una maggiore densità di neuroni CALB-IR nelle parti esterne delle lamelle rispetto alle parti più interne con una netta e progressiva diminuzione del numero delle cellule, fino alla totale scomparsa per lunghi tratti. Nei cuccioli, dove la distribuzione delle CP è uniforme e costante, riscontriamo una media di $8,2 \pm 1,6$ cell/mm. Nei soggetti anziani arriviamo ad una media di $5,1 \pm 0,67$ cell/mm. Questi dati rispecchiano quanto riportato anche in bibliografia. Tra i campioni analizzati c'erano anche due cani anziani di razza Howavart della stessa linea genetica (madre e figlio), che presentavano sintomatologia neurologica riferibile a problematica midollare su base degenerativa (mielopatia degenerativa). In questi due soggetti, a fronte di una conta cellulare totale sovrapponibile a quanto riscontrato negli altri soggetti anziani, vi era una distribuzione omogenea delle CP.

I dati riscontrati in questo studio permettono di considerare la tecnica di immunofluorescenza su tessuti congelati preferibile alle altre tecniche più classicamente riportate in letteratura per la valutazione quantitativa delle CP. L'intensa CALB-IR di tutte le CP genera una migliore risoluzione d'immagine, particolarmente evidente in tessuti ottimamente fissati e conservati. La conta cellulare lungo tutta la lunghezza dello strato delle CP ha consentito di ottenere un dato più preciso con una minore deviazione standard. Ha inoltre permesso di identificare le aree cerebellari in cui le CP non presentano una omogenea distribuzione cellulare.

INDICE

Riassunto	2
Capitolo I	
Sviluppo Embrionale.....	5
Anatomia Macroscopica.....	6
Anatomia Microscopica.....	7
Anatomia Funzionale.....	13
Capitolo II	
Presentazione clinica in corso di disfunzioni cerebellari.....	18
Diagnosi differenziali.....	21
Abiotrofie cerebellari.....	22
Distrofie neuroassonali.....	24
Lipofuscinosi ceroidi.....	25
Capitolo III	
Premessa.....	26
Obbiettivi.....	29
Materiali e metodi	
Casi clinici.....	29
Campionamento dei cervelletti.....	32
Congelamento.....	33
Immunoistochimica.....	34
Immunoenzimatica.....	35
Inclusione in paraffina.....	36
Ematossilina-Eosina.....	37
Risultati.....	38
Cani di Controllo	39
Cani patologici.....	42
Discussione.....	45
Bibliografia.....	51

CAPITOLO I

Sviluppo Embrionale

Il cervelletto costituisce la porzione dorsale del metencefalo. Durante lo sviluppo embrionale si assiste ad un iniziale inspessimento dorso-laterale delle lamine alari del metencefalo; queste protuberanze, denominate labbri rombici, continueranno ad ingrossarsi e a ripiegarsi fino a congiungersi dorsalmente (Figura 1).

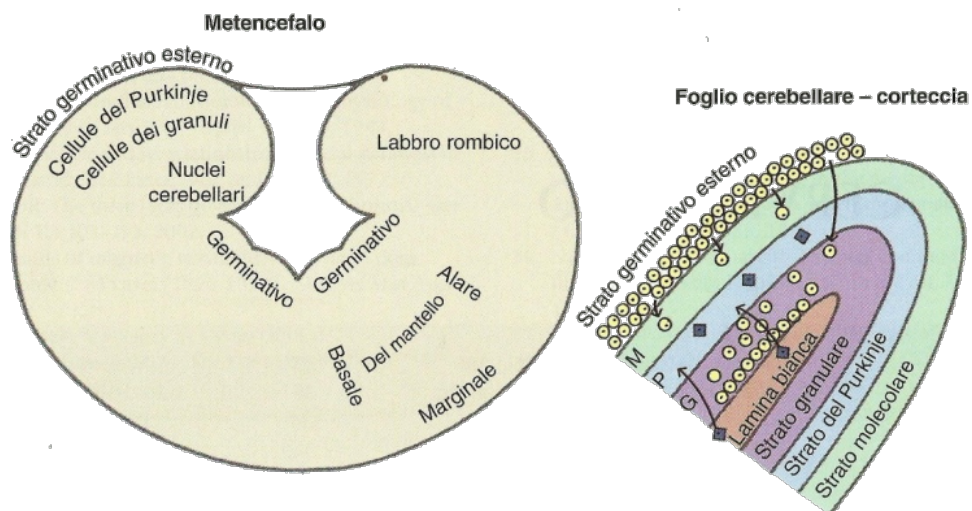


Figura 1. Schema dello sviluppo del cervelletto (de Lahunta et al., 2009)

Ciascun labbro rombico è composto da cellule che proliferano dallo strato germinativo adiacente al quarto ventricolo. Le cellule indifferenziate di questo strato possono seguire due vie di sviluppo:

1) Un gruppo si differenzia in neuroni. Questi neuroni immaturi non si moltiplicano più, ma continuano a crescere e a maturare, dando origine alle cellule di Purkinje, che formano uno strato lungo la corteccia cerebellare, ed ai pirenofori dei nuclei cerebellari. L'intera popolazione delle cellule del Purkinje origina precocemente dalla differenziazione e successiva migrazione delle cellule germinali del labbro rombico e si differenzia in pochi giorni, risultando completa già prima della nascita.

2) La seconda via è quella che porta allo strato di cellule generative. Queste continuano a moltiplicarsi per formare uno strato superficiale chiamato strato germinativo esterno. Durante lo sviluppo delle pieghe cerebellari, queste cellule indifferenziate restano sulla superficie esterna; esse continuano a dividersi, formando uno strato germinativo esterno costituito da 10-12 strati di cellule. La differenziazione avviene lungo il lato interno di questo spesso strato di cellule in moltiplicazione, dove queste interrompono la mitosi e diventano neuroni primitivi che poi migrano internamente nello spessore dello strato. Molte di queste cellule si dirigono più in profondità, oltre lo strato delle cellule del Purkinje, formando i piccoli neuroni (cellule ad artiglio) dello strato granulare della corteccia cerebellare. Lo strato germinativo esterno, inoltre, fornisce i pochi interneuroni (neuroni stellati) che si trovano nello strato più superficiale (strato molecolare) della corteccia cerebellare. Il processo di moltiplicazione dello strato germinativo esterno, contrariamente a quanto avviene nella popolazione delle cellule del Purkinje, continua fino alla tarda gestazione o, in alcune specie, come nel cane e nel gatto, anche dopo la nascita (de Lahunta et al., 2009).

Anatomia Macroscopica

Il cervelletto è una struttura impari e simmetrica posta sopra il IV ventricolo e separata dagli emisferi del telencefalo dalla fessura trasversa cerebrale (*fissura transversa cerebri*). Macroscopicamente distinguiamo una zona centrale denominata verme e due emisferi posti lateralmente ad essa, che costituiscono le zone laterali (Squire et al., 2008). La connessione al tronco encefalico avviene tramite tre paia di processi neuronali che si

estendono su ciascun lato del IV ventricolo, denominati peduncoli cerebellari e distinti in:

- Peduncolo rostrale: connette il cervelletto al mesencefalo; contiene principalmente processi efferenti.
- Peduncolo medio: lo connette con il ponte; contiene principalmente processi afferenti.
- Peduncolo caudale: lo connette con il midollo allungato ed il midollo spinale; anch'esso contiene principalmente processi afferenti.

Profonde fessure trasverse suddividono rostrocaudalmente il cervelletto in tre lobi: l'anteriore o rostrale e il posteriore o caudale, separati tra loro dalla fessura primaria, costituiscono insieme il largo *corpus cerebelli*; il terzo elemento è il lobo flocculonodulare, denominato anche *archicerebellum* o cervelletto vestibolare, separato dal *corpus cerebelli* dalla *fessura uvulonodularis*. Situato sulla faccia ventrale del cervelletto, il lobo flocculonodulare risulta composto da una parte centrale detta nodulo, adiacente al IV ventricolo, e da due piccoli peduncoli laterali, uno su ciascun lato, denominati flocculi.

Anatomia Microscopica

Piccole fessure superficiali suddividono ciascun lobo in lobuli, ognuno dei quali è costituito da sottili pieghe, denominate *folia*; il numero dei *folia* varia per ciascun lobulo ma tutti risultano costituiti da una parte centrale di sostanza bianca denominata corpo midollare. Il corpo midollare (la sostanza bianca) emette una serie di prolungamenti, rivestiti esternamente da sostanza grigia, che si suddividono ripetutamente e che costituiscono le lamelle. Questa elegante arborizzazione viene anche definita “albero della vita”. In sezione trasversale o longitudinale del cervelletto questa estesa area centrale di sostanza bianca è macroscopicamente ben riconoscibile (Figure 2 e 3).

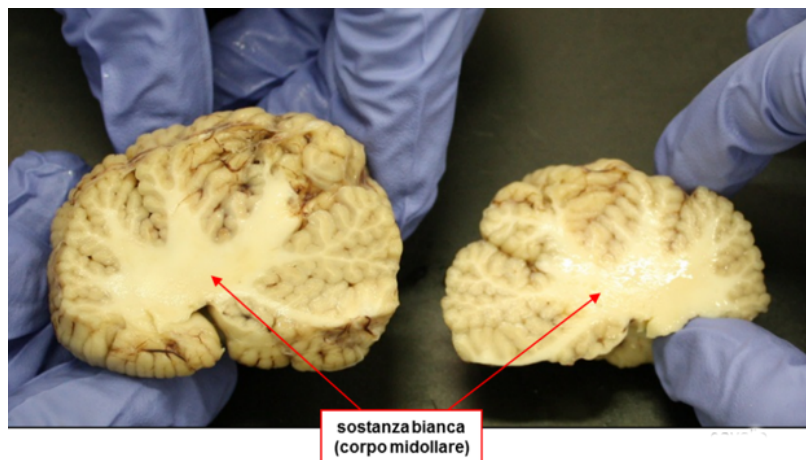


Figura 2. Sezione longitudinale di cervelletto di cavallo



Figura 3. Sezione longitudinale di cervelletto di cane

All'interno del corpo midollare si ritrovano gruppi di pirenofori, tre su ciascun lato rispetto al piano mediano, che costituiscono i nuclei cerebellari; procedendo medio-lateralmente troviamo:

Il nucleo del fastigio: filogeneticamente è il più antico ed il meno variabile tra i mammiferi. Riceve afferenze in massima parte dalla metà ipsilaterale del verme e, in misura minore, dalla metà controlaterale; a queste afferenze si aggiungono collaterali delle fibre muschiate e delle fibre rampicanti. Le sue efferenze, primariamente ispilaterali,

sono dirette principalmente ai nuclei vestibolari e alla formazione reticolare attraverso il peduncolo caudale. Il nucleo interposito: situato vicino al margine laterale del nucleo del fastigio, è relativamente voluminoso; si presenta indiviso in molte specie animali, mentre nei carnivori, in particolare nel cane e nel gatto, è possibile riconoscere due sottonuclei: il nucleo interposito mediale, assimilabile al nucleo globoso dell'uomo, e il nucleo interposito laterale, assimilabile al nucleo emboliforme sempre dell'uomo. Riceve le sue afferenze da una banda corticale paravermiana, mentre le efferenze, attraverso il peduncolo rostrale, sono destinate al tronco encefalico, in particolare al nucleo rosso e alla formazione reticolare. Il nucleo laterale o dentato: presenta uno sviluppo direttamente proporzionale allo sviluppo del neocerebello ed è direttamente correlato al controllo cerebrale sul cervelletto e quindi alla capacità di eseguire movimenti complessi; raggiunge quindi il suo massimo sviluppo nei primati antropoidi, in particolare nell'uomo. Riceve afferenze dalla maggior parte della corteccia cerebellare, mentre l'efferenze attraverso il peduncolo rostrale, sono destinate al nucleo rosso, al collicolo rostrale ed al talamo controlaterale (Barone et al., 2006) (Figura 4).

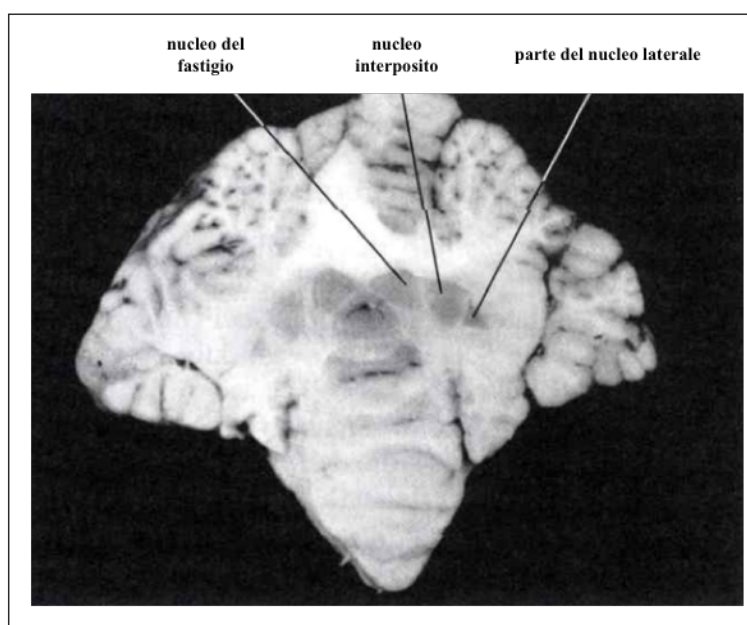


Figura 4. Sezione trasversale di cervelletto di bovino. Si evidenzia la topografia dei nuclei cerebellari. (Bortolami et al., 2009)

La porzione esterna di ciascun *folia* del cervelletto è costituita dalla corteccia cerebellare. Composta da tre strati distinti, presenta una peculiare organizzazione delle strutture neuronali afferenti ed efferenti e dei loro circuiti di interconnessione.

Procedendo dall'esterno all'interno, troviamo:

Strato molecolare. Relativamente privo di cellule, è composto principalmente dai dendriti delle cellule del Purkinje, dagli assoni di neuroni dello strato granulare che inviano nello strato molecolare i loro prolungamenti (fibre parallele) e da una piccola popolazione di interneuroni costituita da due tipi cellulari differenti: le cellule stellate (*stellate cells*) e le cellule a canestro (*basket cells*), entrambe con funzione inibitoria (Squire et al., 2008; Kandel et al., 2013). Le cellule stellate contraggono sinapsi con i dendriti delle cellule del Purkinje, rimanendo sempre nello spessore dello strato molecolare, mentre gli assoni delle cellule a canestro discendono fino al sottostante strato e, arborizzandosi, si connettono con i pirenofori delle cellule del Purkinje.

Strato delle cellule del Purkinje. Come dice il nome stesso, contiene i corpi delle cellule del Purkinje. Queste sono le sole cellule efferenti del cervelletto. Sono cellule grandi con un'elevata attività metabolica e quindi molto sensibili ai processi patologici (Figura 5).

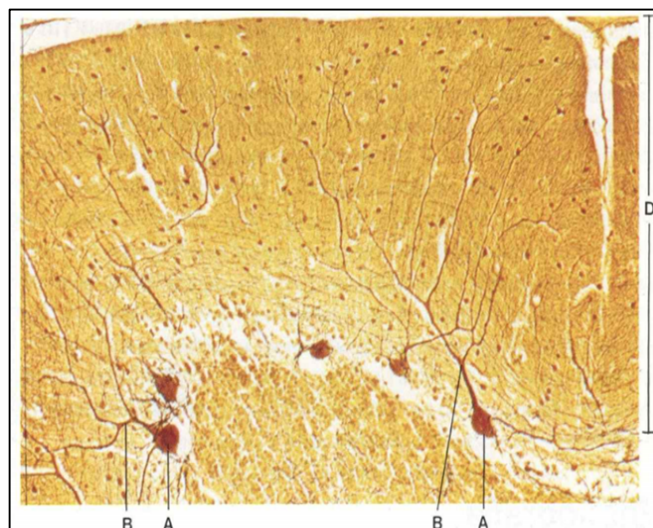


Figura 5. Cervelletto di uomo adulto. (A) Pirenofori delle cellule di Purkinje; (B) dendriti delle cellule di Purkinje, la cui ricca arborizzazione si porta nello strato molecolare. (Bortolami et al., 2009)

Svolgono solo funzione inibitoria tramite il rilascio del neurotrasmettitore acido gamma-amminobutirrico (GABA).

I loro lunghi assoni mielinici attraversano il sottostante strato granulare, dove rilasciano delle diramazioni collaterali che si connettono con i neuroni lì presenti, per poi dirigersi verso il corpo midollare dove contraggono sinapsi con i nuclei cerebellari. Nel sovrastante strato molecolare, i dendriti delle cellule del Purkinje ricevono anche input dalle fibre rampicanti, il secondo maggior tipo di fibre afferenti del cervelletto, oltre che da diversi interneuroni con funzione sia eccitatoria che inibitoria.

Una piccola popolazione di assoni, i cui corpi cellulari sono localizzati principalmente nel lobulo floccolonodulare, lascia il cervelletto attraverso il peduncolo cerebellare caudale e termina sui dendriti dei neuroni nei nuclei vestibolari. Dall'altro capo del corpo cellulare si diramano invece dei processi dendritici che si dirigono verso il sovrastante strato molecolare; queste proiezioni corrono perpendicolarmente alle fibre parallele, precedentemente citate, con cui si interconnettono (Figura 6).

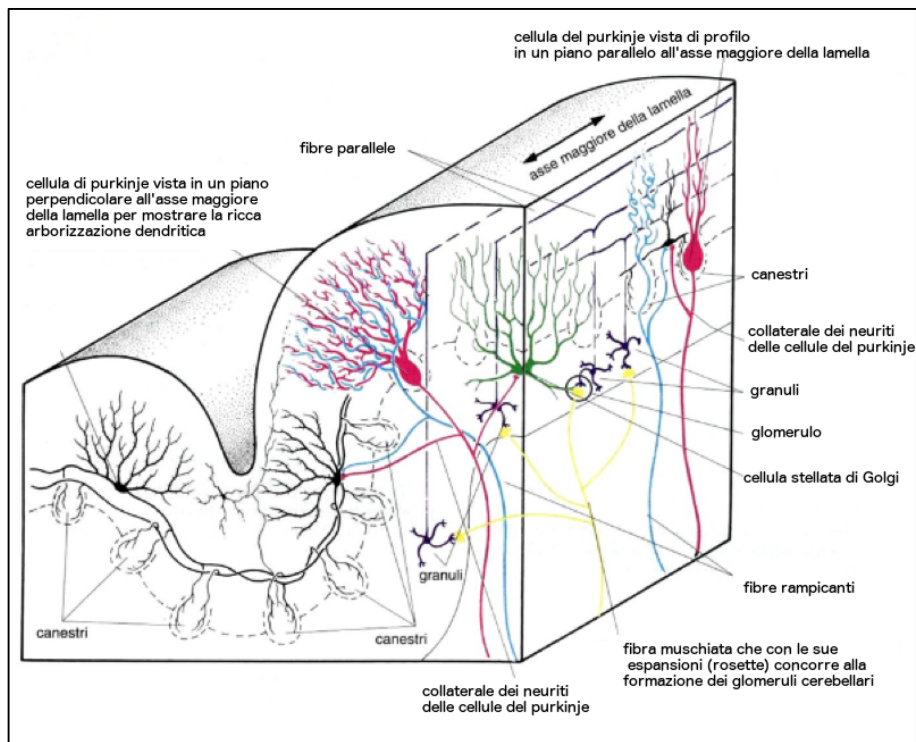


Figura 6. Dimostrazione schematica della disposizione spaziale degli elementi di una porzione di corteccia cerebellare. (Bortolami et al., 2009)

Infine abbiamo lo strato dei granuli, uno spesso strato, estremamente ricco di cellule (3 milioni per cm^3), composto da piccoli pironofori con poco citoplasma e dalle loro zone dendritiche (3-4 brevi dendriti per neurone); si ritiene che il numero delle cellule dello strato granulare sia superiore al numero totale dei neuroni presenti nell'intero sistema nervoso centrale. Qui si ritrovano le cellule granulari (*granule cells*, dette anche “cellule ad artiglio”) e le cellule del Golgi (*Golgi cells*). Le cellule granulari hanno lunghi assoni amielinici che risalgono fino allo strato molecolare dove si dividono a T formando le lunghe fibre parallele che si interconnettono con le diramazioni dendritiche delle cellule del Purkinje, come precedentemente descritto, e svolgono una funzione eccitatoria nei confronti delle stesse cellule del Purkinje. Le cellule del Golgi svolgono invece funzione inibitoria tramite il rilascio del neurotrasmettitore GABA. Sempre in questo strato è possibile ritrovare delle formazioni denominate glomeruli cerebellari: si tratta di complessi sinaptici in cui gli assoni terminali delle fibre muschiate, uno dei due tipi di cellule con funzione di afferenza a livello cerebellare, si connettono, con funzione eccitatoria, alle cellule dei granuli e alle cellule del Golgi, (Kandal et al., 2013) (Figura 7).

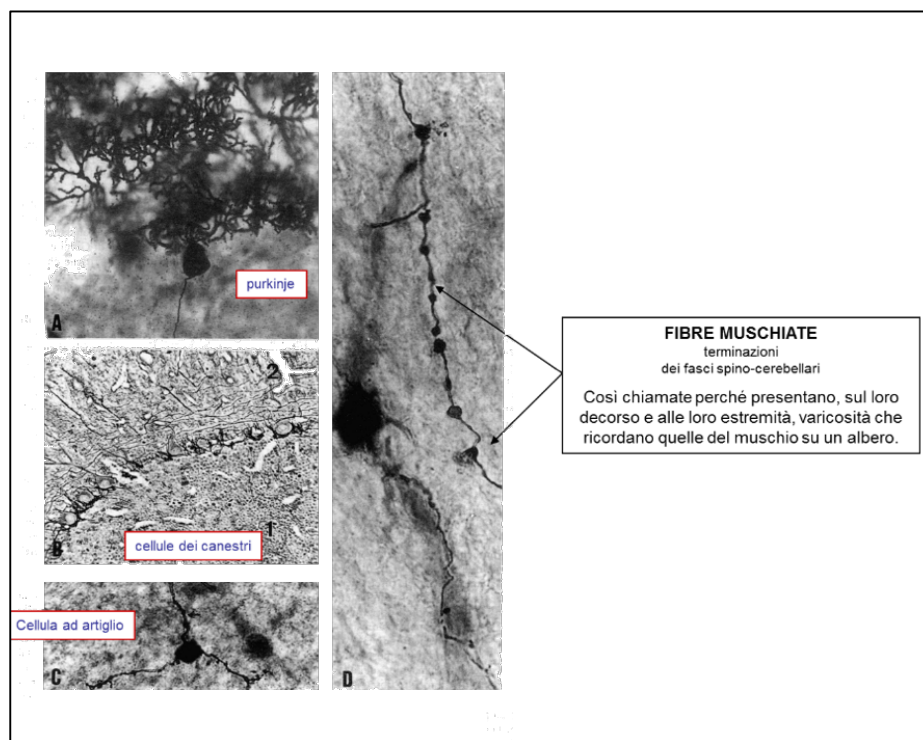


Figura 7. Aspetti delle fibre della corteccia cerebellare. (Bortolami et al., 2009)

Anatomia Funzionale

La complessa interconnessione delle diverse entità neuronali cerebellari tra di loro e con il resto del sistema nervoso centrale permette al cervelletto di intervenire più o meno direttamente in moltissime funzioni. Sia nell'uomo che negli animali regola l'attività motoria, rendendo fluidi e precisi i movimenti volontari, partecipa al mantenimento dell'equilibrio e della postura agendo sul tono dei muscoli estensori antigravitazionali e contribuisce alla regolazione della propriocezione inconscia. Inoltre nell'uomo, con indagini di *neuroimaging* e test neuropsicologici, è stata dimostrata la sua partecipazione anche nelle funzioni cognitive e del linguaggio.

Funzionalmente è possibile suddividere in cervelletto in tre grandi regioni:

- *vestibulocerebellum*
- *spinocerebellum*
- *cerebrocerebellum*

Il *vestibulocerebellum*, denominato anche *archicerebellum*, comprende la regione del lobo flocculonodulare; è la porzione filogeneticamente più antica, presente anche nei pesci. Riceve afferenze dall'apparato vestibolare e visivo, ed invia efferenze ai nuclei vestibolari del tronco encefalico. In funzione di queste interconnessioni, partecipa al mantenimento dell'equilibrio e della coordinazione dei movimenti della testa e degli occhi.

Lo *spinocerebellum* è la regione intermedia e comprendente il verme, la corteccia paravermale ed i nuclei interpositi. E' così denominata in quanto riceve principalmente afferenze somatosensoriali e propriocettive dal midollo spinale tramite le vie spinocerebellari:

- Tratto spinocerebellare dorsale. Origina dalle lamine V e VI dei segmenti lombari. Rimanendo sempre ispilaterale, veicola informazioni somatosensoriali provenienti dall'arto pelvico e dalla metà caudale del tronco attraverso il peduncolo cerebellare caudale. Questo flusso d'informazioni è attivo sia durante il movimento volontario che durante i movimenti passivi.

- Tratto spinocerebellare ventrale. Origina dai medesimi segmenti ma presenta due differenze sostanziali con il tratto dorsale: decussa nel cordone laterale controlaterale fino al peduncolo cerebellare rostrale dove la maggior parte delle fibre decussa nuovamente, mentre una piccola porzione rimane controlaterale, fornendo informazioni anche dalla metà controlaterale; inoltre questo fascio è attivo unicamente durante il movimento volontario. Si ritiene che il cervelletto elabori le informazioni sul movimento deciso con il movimento reale riportato dal tratto dorsale ed attivi le necessarie modifiche di adattamento.
- Tratto cuneocerebellare. Veicola informazioni somatosensoriali ipsilaterali provenienti dagli arti anteriori e dalla parte craniale del corpo.
- Tratto spinocerebellare craniale o rostrale. Anche questo fascio veicola informazioni somatosensoriali provenienti dagli arti anteriori e dalla parte craniale del corpo

La maggior parte delle informazioni che arrivano al cervelletto rimangono anatomicamente ipsilaterali, in quanto quelle fibre che ascendendo decussano a livello di midollare, in massima parte decussano poi nuovamente a livello cerebellare per cui risultano anch'esse funzionalmente ipsilaterali. Solo un numero limitato di fibre, decussando solo una volta, afferisce alla metà controlaterale del cervelletto (Dewey, 2008; de Lahunta et al., 2010; Kandal et al., 2013).

Il *cerebrocerebellum* o *neocerebellum* è la regione più esterna e comprende la porzione laterale di ciascun emisfero cerebellare ed i rispettivi nuclei dentati; è l'area filogeneticamente più recente ed è particolarmente sviluppata nei primati antropoidi, uomo in particolare. La maggior parte delle interconnessioni di questa area, sia afferenti che efferenti, avvengono con la corteccia cerebrale. In particolare, le efferenze, attraverso il nucleo dentato, raggiungono la corteccia motoria e premotoria. E'primariamente responsabile della regolazione dei movimenti fini degli arti e delle mani, e sembra svolgere un ruolo anche in alcuni processi cognitivi legati ai lavori manuali (Dewey, 2008; Squire et al., 2008; de Lahunta et al., 2009; Kandal et al., 2013).

Altre vie afferenti cerebellari molto importanti, oltre quelle fin qui descritte, sono quelle provenienti da alcune strutture del tronco encefalico. Dal nucleo rosso originano le fibre

rubrocerebellari che penetrano nel cervelletto attraverso il peduncolo cerebellare rostrale. Dal nucleo olivare origina il tratto olivocerebellare che, dopo decussazione a livello di linea mediana, raggiungono la corteccia cerebellare ed i nuclei cerebellari attraverso il peduncolo cerebellare caudale controlaterale. Questo fascio di assoni sono la maggior fonte di fibre rampicanti afferenti al cervelletto. Il nucleo pontino funziona da centro d'integrazione per la proiezione degli assoni da tutte le aree della corteccia cerebrale, in particolare dell'aree visive ed uditive, al cervelletto controlaterale attraverso la decussazione del tratto cerebropontocerebellare. Infine, gli assoni originati dalla sostanza reticolare costituiscono il tratto reticolocerebellare che afferisce al cervelletto attraverso il peduncolo cerebellare caudale. Tutte queste strutture del tronco encefalico afferiscono al cervelletto dopo aver ricevuto proiezioni dai nuclei della base telencefalici e dalle aree della corteccia cerebrale motoria, permettendo un'ampia e complessa proiezione dell'informazione dalla corteccia cerebrale al cervelletto (de Lahunta et al., 2009).

In generale, tutte le afferenze cerebellari sono ad appannaggio fondamentalmente di due tipi differenti di fibre, distinte per la morfologia dei loro terminali assonici (de Lahunta et al., 2009; Kandel et al., 2013):

- fibre muschiate
- fibre rampicanti

Le fibre muschiate originano primariamente dal midollo spinale e dai nuclei pontini e vestibolari. Entrate nel cervelletto, dai processi assonali principali si dipartono delle diramazioni collaterali che terminano nei nuclei cerebellari, mentre l'assone principale, attraversando il corpo midollare, contrae sinapsi con le cellule dello strato dei granuli, interneuroni eccitatori, formando i glomeruli cerebellari; ogni singola cellula dei granuli riceve input solo da poche fibre muschiate, ma grazie all'architettura degli assoni delle cellule dei granuli stesse, che andranno poi ad interagire secondariamente con le cellule del Purkinje, l'informazione di una singola fibra muschiata viene inviata ad un elevato numero di cellule del Purkinje.

Le fibre rampicanti originano invece dai nuclei olivari, localizzati nella porzione ventrolaterale del midollo allungato caudale, e veicolano le informazioni sensoriali provenienti dalla corteccia cerebrale e dal sistema nervoso periferico. Anche in questo

caso, entrate nel cervelletto, si dipartono delle diramazioni collaterali che terminano nei nuclei cerebellari, mentre l'assone principale contrae sinapsi con le diramazioni dendritiche delle cellule del Purkinje nello strato molecolare, intrecciandosi tra loro come un ramo di vite sull'albero, da qui il nome delle fibre stesse, creando così numerosi contatti intersinaptici. Ogni fibra rampicante può contattare sinapsicamente da 1 a 10 neuroni del Purkinje, mentre ogni cellula del Purkinje riceve una sola singola fibra rampicante.

Sia le fibre muschiate che le rampicanti svolgono una funzione eccitatoria a livello di nuclei cerebellari, di neuroni granulari e del Purkinje, mediante il rilascio a livello di sinapsi di acetilcolina e aspartato, rispettivamente (Squire et al., 2008; de Lahunta et al., 2009; Kandal et al., 2013).

L'efferenze cerebellari invece, come già ricordato nel corso del presente capitolo, sono ad appannaggio esclusivo delle cellule del Purkinje. Quelle derivanti dal lobo flocculonodulare si dirigono direttamente ai nuclei vestibolari attraverso il peduncolo cerebellare caudale, mentre tutte le altre si dirigono ai nuclei cerebellari da cui si dipartono le efferenze dirette a diverse aree cerebrali e pontine. Questa particolare interconnessione permette un circuito di feedback tra cervelletto e corteccia cerebrale.

CAPITOLO II

Presentazione clinica in corso di disfunzioni cerebellari

Come già ricordato, il cervelletto svolge molteplici funzioni, anche a livello cognitivo, ma nella pratica clinica veterinaria, il suo ruolo più significativo, ed anche il solo attualmente indagabile clinicamente negli animali, è quello di coadiuvare l'attività motoria, modulandone l'ampiezza e la precisione dei movimenti, rendendoli fluidi e precisi, e di mantenere l'equilibrio e la postura, regolando il tono muscolare e la propriocezione inconscia.

La presentazione clinica di un paziente con problematica cerebellare può essere molto varia in dipendenza di diversi fattori quali la natura della patologia, il suo decorso e le aree cerebellari primariamente interessate.

Analizzando singolarmente le varie voci dell'esame neurologico, nelle sindromi cerebellari pure, quindi senza interessamento di altre aree encefaliche, possiamo riscontrare i seguenti deficit:

Stato mentale: come già specificato, clinicamente in medicina veterinaria, non si riscontrano alterazioni dello stato mentale.

Postura: alcuni pazienti possono presentare, in stazione, una base d'appoggio allargata. In alcuni casi sono anche riscontrabili delle oscillazioni, più o meno grossolane, di tutto il corpo sia in senso longitudinale che trasversale, che prendono il nome di titubazioni; oscillazioni o tremori più fini possono essere osservate a livello di testa e collo e vengono definite come tremori a riposo; questi tremori si aggravano o si palesano completamente (i tremori a riposo non sono sempre riscontrabili) nel momento in cui l'animale tenta di eseguire un movimento fine, tipo la prensione del cibo (tremori intenzionali); queste oscillazioni sono dettate dalla mancanza di coordinazione cerebellare e dai continui movimenti antitetici di correzione, elaborati a livello cerebrale. Un altro possibile quadro clinico è la cosiddetta sindrome vestibolare paradossa: si tratta di una sindrome

vestibolare, in cui però l'*head-tilt*, è controlaterale alla lesione, diversamente da quanto accade nelle sindromi vestibolari classiche in cui tutti i deficit sono ipsilaterali (da qui la denominazione di “paradosa”). E' dovuta ad una lesione del lobulo flocculonodulare e, conseguentemente, alla perdita della sua funzione inibitoria sui nuclei vestibolari ipsilaterali del tronco encefalico; questo comporta un ipertono muscolare di collo ed arti ipsilaterali con conseguente rotazione della testa dal lato opposto (Dewey, 2008; de Lahunta et al., 2009; Bernardini, 2010).

Andatura: la principale manifestazione clinica che possiamo riscontrare è l'atassia cerebellare (Foto 8): un'incoordinazione motoria degli arti caratterizzata da inabilità a modulare la giusta ampiezza dei movimenti (dismetria) che spesso risulta esagerata (ipermetria). Solitamente più evidente negli arti anteriori, che assumono la classica andatura detta “passo dell’oca” (Foto 9), è riscontrabile già alla normale deambulazione in piano, ma risulta sicuramente esacerbata quando è richiesta una maggiore precisione di movimento come nel salire gradini o scale; questo deficit è dovuto alla mancata inibizione neuronale delle cellule del Purkinje sui neuroni dei nuclei cerebellari che hanno invece un'azione facilitatoria; oltre l'atassia è possibile riscontrare un ipertono degli arti che possono apparire quasi spastici. Non ci sarà mai paresi.

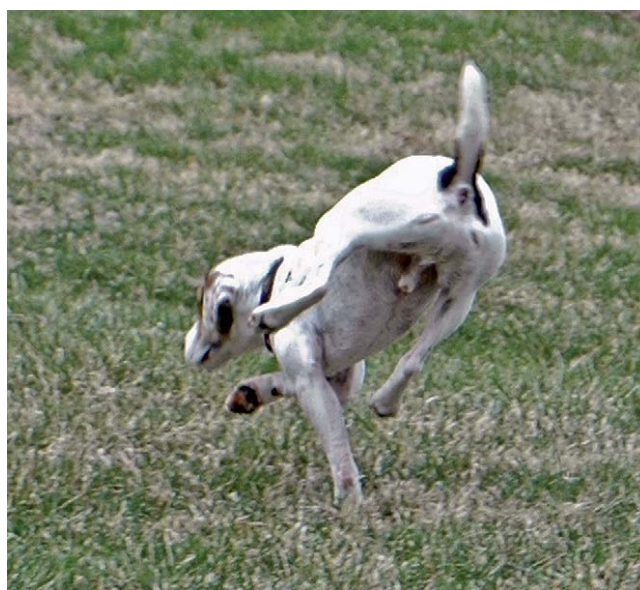


Figura 8. Jack Russell terrier con atassia cerebellare. (Lorenz et al., 2011)



Figura 9. Cuccioli di Jack Russell terrier con ipermetria degli arti toracici. (Lorenz et al., 2011)

Reazioni posturali e propriocezione: ricordiamo che esiste una propriocezione conscia, che viaggia attraverso i fascicoli gracile e cuneato, i fasci del lemnisco mediale, il talamo e che viene elaborata dalla corteccia cerebrale, ed una propriocezione incoscia, elaborata dal cervelletto attraverso i fasci spinocerebellare dorsale e ventrale, che veicolano le informazioni propriocettive provenienti dal tronco e dagli arti pelvici, ed il fascio cuneocerebellare, che veicola le informazioni propriocettive provenienti dagli arti toracici e dalla regione cervicale (de Lahunta et al., 2009; Bernardini, 2010); sebbene sia molto difficile nella pratica clinica distinguere i deficit di una dall'altra, in corso di problematica cerebellare è possibile riscontrare deficit della propriocezione incoscia: questo si manifesterà con un ritardo nell'inizio del movimento ed un riposizionamento propriocettivo esagerato e fuori asse; durante l'esecuzione delle manualità per testare le reazioni posturali è inoltre possibile osservare un'esacerbazione della spasticità degli arti (de Lahunta et al., 2009; Bernardini, 2010).

Riflessi spinali: tutti i riflessi spinali risultano nella norma.

Nervi cranici: solitamente non si hanno deficit dei nervi cranici se non in alcuni casi particolari. In corso di lesioni cerebellari diffuse, soprattutto quando è coinvolto anche il nucleo interposito, è possibile riscontrare deficit di reazione della minaccia di grado variabile (Dewey, 2008; de Lahunta et al., 2009; Bernardini, 2010). Lesioni che coinvolgono il nucleo del fastigio possono causare anisocoria con midriasi iporesponsiva

ed eventuale procidenza della terza palpebra nell'occhio controlaterale al nucleo lesionato; la medesima sintomatologia è riscontrabile con lesioni del nucleo interposito, ma in questo caso sarà interessato l'occhio ipsilaterale alla lesione (Dewey, 2008; de Lahunta et al., 2009). In corso di lesioni del lobo flocculonodulare è possibile riscontrare un nistagmo posizionale in cui solitamente non è possibile riconoscere la fase lenta e la fase veloce (de Lahunta et al., 2009).

Diagnosi differenziali

Il cervelletto può essere interessato da molteplici processi patologici come le altre strutture encefaliche. Seguendo l'acronimo VITAMIND, possiamo così classificare le patologie del cervelletto nel cane:

- **Vascolare**: infarti; emorragie; ischemie.
- **Infiammatorio/infettivo**: meningoencefaliti ad eziologia sconosciuta (GME) o ad eziologia infettiva (protozoarie, virali, batteriche o micotiche).
- **Traumatico**: trauma cranico.
- **Anomalo/congenito**: ipoplasia-aplasia; cisti; idrocefalia.
- **Metabolico**: non sono documentate patologie metaboliche del cervelletto.
- **Idiopatico**: non sono documentate patologie idiopatiche del cervelletto.
- **Neoplastico**: tumori primari (meningioma; glioma; medulloblastoma; linfoma; papilloma dei plessi corioidei) o metastatici.
- **Degenerativo**: abiotrofie cerebellari e multisistemiche; distrofie neuroassonali; degenerazioni spinocerebellari; degenerazioni spongiformi; leucodistrofie; malattie d'accumulo lisosomiale; lipofuscinosi ceroidi.

Il protocollo diagnostico è ovviamente strettamente dipendente dal sospetto diagnostico maturato in seguito alla visita clinica e neurologica, e può prevedere esami emato-biochimici completi, test sierologici, studio di risonanza magnetica ed esame del liquido cefalorachidiano.

Le patologie che primariamente comportano istopatologicamente una diminuzione delle cellule del Purkinje (CP) ed una variazione degli spessori degli strati della corteccia cerebellare sono alcuni dei processi di natura neurodegenerativa, primi fra tutte le abiotrofie; analoghi reperti, seppure in forma meno marcata, si riscontrano però anche in corso di distrofie neuroassonali, lipofuscinosi, degenerazione spinocerebellare progressiva.

Abiotrofie Cerebellari

In neuropatologia è convenzione indicare con il termine abiotrofia una prematura degenerazione e perdita, a seguito di un'anomalia funzionale, di un numero cospicuo di cellule neuronali, talvolta in più popolazioni funzionalmente correlate.

L'*abiotrofia cerebellare*, definita più recentemente come degenerazione corticale cerebellare, è un patologia neurodegenerativa principalmente del cane (oltre 30 razze canine), ma riportata anche nel gatto, seppur con minor frequenza (de Dewey, 2008; Lahunta et al., 2009; Bernardini, 2010). E' un processo per cui, dopo un normale sviluppo, si verifica una degenerazione precoce delle cellule nervose a causa di un difetto metabolico intrinseco che non ne permette la normale sopravvivenza. Sebbene non sia ancora del tutto chiarita l'eziopatogenesi, in molti casi è stata stabilita un'ereditarietà autosomica recessiva. Si riconoscono 2 forme:

- 1) *Forma classica*: è la più comune ed è caratterizzata da una degenerazione intrinseca delle CP con conseguente grave perdita delle stesse e successivo parziale interessamento anche degli strati molecolare e granulare; questa forma è

tipica di molte razze tra cui l'American Staffordshire, Beagle, Setter Gordon e Rhodesian Ridgbacks.

- 2) *Forma granulo priva*: la lesione primaria è a carico dello strato dei granuli con eventuale successivo interessamento delle CP che risultano relativamente diminuite, soprattutto nella parte periferica delle lamelle; questa forma è tipica del Border Collie e dello Scottish Terrier; nel Coton de Tulear una simile lesione è stata imputata ad una reazione infiammatoria su base autoimmunitaria.

L'età d'insorgenza dei sintomi è estremamente varia e può differire molto tra razze ed individui diversi, come molto varia è anche la progressione; può infatti esserci sia un'insorgenza precoce, tra i 3 e i 12 mesi che tardiva, tra i 2 e gli 8 anni e decorsi che variano da alcuni mesi ad anni. La diagnosi definitiva solitamente è *post-mortem*: sebbene in alcuni casi (forme ad insorgenza precoce e a rapida progressione) è possibile rilevare in corso di RM (sequenza trasversali pesate in T2) un ridotto volume cerebellare con conseguente allargamento dei solchi ed aumento *ex vacuo* dello spazio liquorale, la diagnosi *ante-mortem* non è ancora possibile in assenza di chiare alterazioni volumetriche del cervelletto. Il grado di degenerazione osservabile alla necropsia è in dipendenza dello stadio di progressione della malattia. Nei casi acuti si può riscontrare una degenerazione ischemica delle CP, mentre nelle forme più croniche le CP possono mancare del tutto, associate a evidente iperplasia della glia di Bergman (astrociti di Bergman) e ad eventuale degenerazione walleriana della sostanza bianca cerebellare; occasionalmente, possibili alterazioni regressive sono evidenti a carico anche dei nuclei cerebellari, quale espressione di degenerazione trans-sinaptica, e a carico dei nuclei olivari e pontini, quale espressione di degenerazione retrograda; in corrispondenza delle CP scomparse, le colorazioni all'impregnazione argentea evidenziano i tipici *empty basket*. (Cantile et al., 2002; Mandara et al., 2011)

Le *abiotrofie multisistemiche* sono forme rare in cui, accanto alla progressiva degenerazione e perdita di neuroni della corteccia cerebellare, si assiste alla concomitante degenerazione di altre popolazioni neuronali, sensitive o motorie, somatiche o vegetative. Sono state riscontrate in varie specie tra cui cane (Cocker Spaniel, Barboncino Nano,

Kerry Blu Terrier), capra, suino e, solo raramente, nel gatto. Sono tutte forme molto precoci che solitamente si manifestano clinicamente entro il primo anno di vita (Tatalick et al., 1993; Flegel et al., 2007; Dewey, 2008; de Lahunta et al., 2009; Bernardini, 2010; Huska et al., 2013; Nibe et al., 2007, 2010)

Distrofie Neuroassonali (NAD)

Sia in medicina umana che in medicina veterinaria, rappresentano un gruppo eterogeneo di rare malattie neurodegenerative. Istologicamente sono caratterizzate dalla presenza di rigonfiamenti assonali terminali, detti corpi sferoidi, in tutto il sistema nervoso, con ampia variabilità di distribuzione nelle diverse forme. Queste alterazioni possono interessare sia la sostanza grigia che la sostanza bianca in differenti aree midollari ed encefaliche, ma sono maggiormente riscontrabili nella sostanza grigia degli emisferi cerebrali, nel cervelletto e nel tronco encefalico. In associazione a questi corpi sferoidi, a livello di cervelletto, è possibile riscontrare una riduzione numerica delle CP, che appaiono comunque normoconformate, ed una riduzione dello spessore dello strato dei granuli (Nibe et al., 2007, 2010; Hahn et al., 2015). Queste alterazioni cerebellari risultano comunque meno marcate rispetto a quanto si può riscontrare nelle abiotrofie. In alcuni studi è stato anche dimostrato, in cani, gatti e cavalli affetti da NAD, un abnorme aumento di proteine leganti il calcio, sebbene non sia ancora chiara la relazione tra questo dato e la degenerazione neuroassonale. L'eziopatogenesi è ancora tutt'oggi oggetto di studi, sebbene si sospettino primariamente dei difetti, su base genetica, dei meccanismi di trasporto assonale con conseguente anomalo deposito intracellulare di diversi metaboliti. Le NAD sono ormai riconosciute in varie specie (uomo, cane, gatto, cavallo, pecora) e, specificatamente nel cane, sono documentate in diverse razze, ognuna con una sua propria specifica presentazione clinica. Le forme più precoci, con segni clinici evidenti già a pochi mesi di vita, si osservano in Chihuahua, Papilion, Collie, Boxer e Jack Russel. La forma del Jack Russel in particolare, è riconosciuta come modello animale della corrispondente forma giovanile dell'uomo, la sindrome infantile di Seitelberger. Clinicamente più tardiva è invece la forma che interessa il Pastore Tedesco ed il Rottweiler, manifestandosi tra il primo e il secondo anno di vita. La NAD del Rottweiler è tra le più diffuse, e quindi tra le più studiate. Clinicamente insorge con segni di atassia

cerebellare (ipermetria) del treno anteriore all'età di un anno, rare volte più precocemente, e progredisce nell'arco dei successivi 2-4 anni. In stadi successivi della malattia compaiono anche tremore della testa e nistagmo; in alcuni casi possono associarsi problemi di deglutizione e di fonazione. Questa forma corrisponde alla sindrome giovanile di Hallervorden-Spatz dell'uomo.

Lipofuscinosi Ceroide (NCL)

La Lipofuscinosi Ceroide (NCL) è un gruppo eterogeneo di malattie da accumulo lisosomiale dell'uomo e degli animali. A causa di mutazioni genetiche, vi è un accumulo di lipopigmenti nelle cellule nervose, nelle cellule della retina, nella pelle e in altre cellule del corpo. Questo accumulo nei neuroni conduce alla disfunzione progressiva e infine alla morte di queste cellule. Anche in questo caso possiamo avere un'atrofia cerebellare con diminuzione delle CP e, soprattutto, una diminuzione dello spessore dello strato dei granuli. Esistono diverse forme di NCL, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, distinte principalmente sulla base dell'ultrastruttura del materiale depositato all'interno delle cellule.

La NCL è stata segnalata in diverse razze di cane tra cui Setter Inglese, Bassotto, Cocker Spaniel, Border Collie, Labrador e Golden Retriever. Clinicamente, dato il coinvolgimento di diverse strutture intracraniche, si può avere un insieme di manifestazioni che possono differire da un soggetto ad un altro a seconda delle aree maggiormente interessate; i sintomi possono includere alterazione dello stato mentale e del comportamento, atassia cerebellare, crisi epilettiche e disturbi visivi, fino alla completa cecità. L'insorgenza dei sintomi è solitamente entro i primi anni di vita (1-3 anni), sebbene siano documentati casi in soggetti più anziani, anche fino ai 7 anni. La progressione della sintomatologia è variabile, ma la prognosi è sempre infausta (Minatel et al., 2000; Rossmesl et al., 2003; Evans et al., 2005; Dewey, 2008; Katz et al., 2011; Mizukami et al., 2011, 2012; Gilliam et al., 2015).

CAPITOLO III

Premessa

La maggior parte degli studi morfologici e morfometrici eseguiti sul cervelletto prendono in considerazione tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina, sezionati al microtomo e processati con differenti colorazioni istologiche (ad es. ematossilina-eosina; Acido periodico-reattivo di Schiff; crisilvioletto; Luxol Fast Blue; Sudan Black; Bielschowsky; Kluver-Barrera; Blu di toluidina). Altri studi hanno associato, alle classiche colorazioni istologiche, tecniche immunoistochimiche. Alcuni autori (Tatalick et al., 1993; Cantile et al., 2002; Flegel et al., 2007; Nibe et al., 2010; Urkasemsin et al., 2010, 2012; Huska et al., 2013), hanno utilizzato l'anticorpo anti-proteina fibrillare acida della glia (GFAP) per valutare il grado di astrocitosi in cervelletti di cani con sintomatologie riferibili a forme cerebellari di natura degenerativa. In alcuni studi eseguiti sul cervelletto dell'uomo (Whitney et al., 2008; Kamionowska et al., 2009; Babij et al., 2013; Flace et al., 2014) è stato invece utilizzato l'anticorpo anti-calbindina (Calb) per effettuare un'analisi quantitativa delle CP. Recentemente (Stepien et al. 2012), oltre gli anticorpi già citati, sono stati utilizzati anche gli anticorpi anti-calretinina (CR) e anti-parvalbumina (PV) per valutare l'espressione delle diverse proteine leganti il calcio nelle diverse popolazioni neuronali a livello di corteccia cerebellare di pazienti con Alzheimer; in questo articolo è stato anche evidenziato come le CP siano immunoistochimicamente reattive alla Calb, mentre risultano assolutamente non reattive alla CR e al GFAP e solo parzialmente reattive alla PV. Nel lavoro di Bartschat et al. (2012) oltre alla Calb è stato utilizzato il Fattore Indotto dalla Ipossia (HIF) per indagare gli effetti dell'ipossia sulle CP in campioni cerebellari umani. Nel 2008, Alvarez e collaboratori hanno utilizzato in combinazione GFAP e CR per valutare il pattern di distribuzione dei neuroni CR-reattivi e delle fibre nel cervelletto di pecore. Alcuni studi sono stati condotti anche su modelli murini utilizzando la Calb da sola (Wallace et al., 2010) o associata a CR e PV (Fortin et al., 1997; Dusart et al., 1999; Choi et al., 2010; Wierzba-Bobrowicz et al., 2011; Sarna et al., 2011).

In tutti gli studi sopra citati, l'analisi quantitativa delle CP è stata effettuata prendendo in considerazione solo alcuni campi (da 5 a 50) della sezione scelti random (Tatalick et al., 1993; Nibe et al., 2010; Bartschat et al., 2012). In queste sezioni scelte random, sono poi stati contati i neuroni immunoreattivi seguendo lo strato delle CP, ed esprimendo quindi la misura in millimetri lineari (Pugliese et al., 2007; Alvarez et al., 2008) o valutando la densità delle CP in una determinata area espressa in mm^2 (Choi et al., 2010; Stepien et al., 2012) (Figura 10). In un solo studio (Urkasemsin 2012) la sezione di tessuto cerebellare è stata suddivisa delineando una griglia formata da 6 linee tra loro intersecate (3 orizzontali e 3 verticali) su un'area di $90000 \mu\text{m}^2$: le CP con nucleo ben visibile sono state contate lungo il decorso delle singole linee della griglia e la media delle CP è stata poi rapportata ad ogni singola sezione di linea (Figura 11).

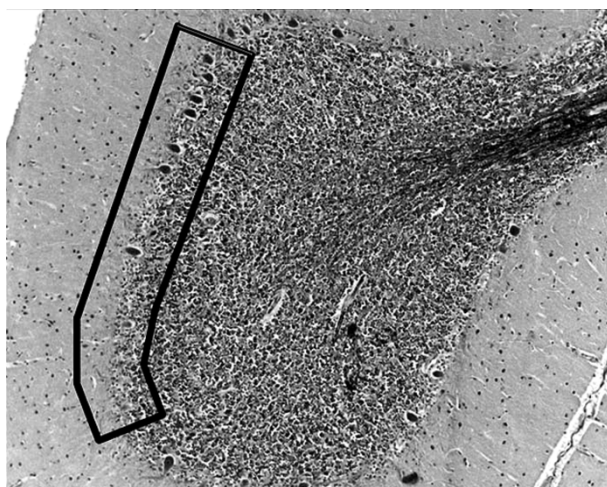


Figura 10: Area riportata nell'articolo di Stepien (2012)

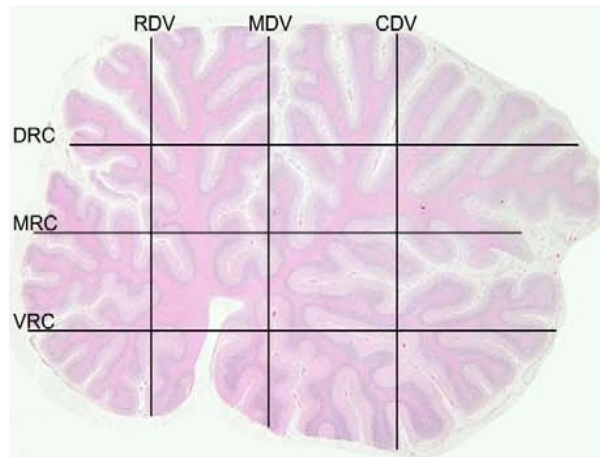


Figura 11: Griglia riportata nell'articolo di Urkasemsin (2012)

Le regioni cerebellari principalmente considerate in medicina umana sono state gli emisferi cerebellari: questo è ovviamente in dipendenza del fatto che gli emisferi cerebellari costituiscono il neocerebello, direttamente correlato alla capacità di eseguire movimenti complessi e coinvolto anche in alcune funzioni cognitive ed emozionali, e che raggiunge il suo massimo sviluppo nei primati antropoidi, in particolare nell'uomo. In medicina veterinaria invece, sono stati eseguiti studi su lobo flocculonodulare, lingula e uvula (Fortin et al., 1998; Schwaller et al., 2002; Urkasemsin et al., 2010, 2012). In alcuni studi (Tatalick et al., 1993; Huska et al., 2013), alla valutazione delle CP è stata anche associata la misurazione degli spessori degli strati della corteccia cerebellare.

Le tecniche di valutazione quantitativa del tessuto cerebellare riportate in letteratura non consentono una valutazione morfometrica/quantitativa dettagliata del tessuto cerebellare in relazione ai singoli lobi. Non consentono inoltre di valutare con rigore scientifico possibili variazioni fisiologiche, in relazione al segnalamento dei soggetti analizzati (razza ed età), e/o patologiche del numero delle CP e dello spessore degli strati della corteccia cerebellare all'interno di differenti lamelle, lobuli e lobi cerebellari.

Nel presente lavoro è stata fotografata l'intera area cerebellare di cane a livello di verme; le fotografie eseguite con ingrandimento 40x sono state assemblate con la modalità mosaico. Tutte le cellule del Purkinje presenti nella sezione sono state contate e rapportate ad ogni singolo lobo; in ogni singolo lobo, inoltre, sono state eseguite tre misurazioni dello spessore dello strato molecolare e tre dello strato dei granuli

Obiettivi

Il presente progetto di ricerca si è posto l'obiettivo di valutare, in sezioni complete di verme cerebellare di cane:

Numero e distribuzione delle cellule del Purkinje.

Spessore dello strato dei granuli.

Spessore dello strato molecolare.

Correlare i dati ottenuti con possibili variazioni fisiologiche o patologiche in relazione al segnalamento dei soggetti analizzati (razza ed età) e/o a patologie neurologiche presenti al momento dell'eutanasia.

Confrontare i dati ottenuti da sezioni sagittali dell'intero verme cerebellare (criosezioni e sezioni di tessuti inclusi in paraffina) sottoposte poi a colorazione classica (ematossilina/eosina) e a reazioni di immunostochimica utilizzando un anticorpo anti-calbindina.

Valutare i dati ottenuti con la presente metodica di lavoro rispetto a quelli classicamente riportati in letteratura.

Materiali e Metodi

Casi clinici

Nel presente studio sono stati analizzati 8 cervelletti prelevati da soggetti afferiti all'Ospedale Didattico Veterinario (ODV) "Giuseppe Gentile" dell'Alma Mater Studiorum, dell'Università di Bologna, e sottoposti ad eutanasia per gravi problematiche mediche. I pazienti con sintomatologia neurologica sono stati tutti visitati presso il servizio di neurologia clinica dell'ODV.

L'età dei pazienti presi in esame variava dai 2 mesi ai 16 anni (media 7,5 anni \pm 5,3 anni) con netta prevalenza di soggetti anziani: sei soggetti avevano un'età compresa tra 9 e 16 anni; un soggetto giovane adulto di 2 anni; infine due cuccioli, di 2 e 6 mesi.

Le razze rappresentate erano: Pastore Tedesco (n=1), Hovawart (n=2), Pastore Belga (n=1), Setter Inglese (n=1), Meticcio (n=1), Labrador Retriever (n=1), Alano (n=1).

Le presentazioni cliniche sono state:

- 1) Pastore Belga (12 anni): è stato sottoposto a visita neurologica per paraplegia. La neurolocalizzazione clinica è stata riferita al midollo spinale toraco-lombare (T3-L3) e in diagnosi differenziale è stata considerata una forma degenerativa (ernia discale) o neoplastica. All'esame necroscopico sono state riscontrate due ernie discali ed ossificazione del legamento denticolato.
- 2) Labrador (10 anni): anche questo soggetto è stato sottoposto a visita neurologica per paraplegia. La neurolocalizzazione clinica è stata riferita al midollo spinale toraco-lombare (T3-L3) e in diagnosi differenziale è stata considerata una forma degenerativa (ernia discale) o neoplastica. L'esame necroscopico ha confermato la presenza di ernia discale.
- 3) Setter Inglese (15 anni): Sottoposto ad eutanasia per incontinenza urinaria.

- 4) Alano (2 anni): è stato portato in visita presso l'ODV per importante sintomatologia gastro-intestinale ed algia addominale; è stata eseguita eutanasia intraoperatoria per volvolo mesenterico che aveva determinato la necrosi di buona parte del piccolo intestino.
- 5) Pastore Tedesco (2 mesi): aveva una storia anamnestica di deficit deambulatori, inizialmente solo degli arti pelvici, poi rapidamente progrediti anche agli arti toracici, riscontrati inizialmente a 3 settimane di vita; al momento della visita neurologica, il paziente presentava ipermetria degli arti toracici e tetraparesi, tremori diffusi a testa, tronco ed arti e deficit di riposizionamento alle prove propriocettive. La neurolocalizzazione clinica è stata riferita al cervelletto e in diagnosi differenziale sono state poste forme infiammatorie/infettive (neosporosi) e forme degenerative (abiotrofia cerebellare). Dopo circa un mese, in considerazione dell'importante e rapido aggravamento delle condizioni cliniche, è stata eseguita l'eutanasia. All'esame necroscopico è stata riscontrata ipotrofia cerebellare. La proprietaria ha riferito in seguito anche di un altro soggetto di altra cucciolata (stessa madre ma padre diverso), che aveva presentato la medesima sintomatologia e decorso. Anche questo secondo cucciolo, che non è stato seguito dal servizio di neurologia clinica dell'ODV, ma da altra struttura, è stato sottoposto ad eutanasia. Sebbene in questo secondo caso non siano stati eseguiti indagini post-mortem e quindi non sia stato possibile confrontare i dati dei due casi, la corrispondenza dei due quadri clinici, riferibili alla stessa linea genetica (stessa madre), ha supportato l'ipotesi diagnostica di una possibile problematica degenerativa su base genetica.
- 6) Meticcio (6 mesi): è stato sottoposto a visita neurologica per deficit deambulatori a carico dei quattro arti, insorti da circa 2 mesi e lentamente ingravescenti; alla visita neurologica presentava lesioni da automutilazione a carico della porzione distale degli arti, particolarmente di quelli pelvici, con assenza di nocicezione alle estremità distale degli arti pelvici, dubbio nei toracici (sindrome da mutilazione acrale), moderata atassia, dorsoflessione spontanea, ariflessia flessoria nei quattro arti. La neurolocalizzazione clinica è stata riferita al sistema nervoso periferico e in diagnosi differenziale è stata considerata una polineuropatia sensoriale.

- 7) Hovawart (11 anni): è stato riferito per gravi deficit deambulatori degli arti pelvici, insorti da alcuni mesi e progressivamente ingravescenti; alla visita neurologica entrambi i pazienti presentavano marcata atassia degli arti pelvici e deficit propriocettivi sempre di questi. La neurolocalizzazione clinica è stata riferita al midollo spinale toraco-lombare (T3-L3) e in diagnosi differenziale è stata considerata una forma degenerativa (mielopatia degenerativa).
- 8) Hovawart (9 anni): appartenente alla stessa linea familiare del precedente Hovawart (madre e figlio), è stato riferito per gravi deficit deambulatori degli arti pelvici, insorti da alcuni mesi e progressivamente ingravescenti; alla visita neurologica entrambi i pazienti presentavano marcata atassia degli arti pelvici e deficit propriocettivi sempre di questi. La neurolocalizzazione clinica è stata riferita al midollo spinale toraco-lombare (T3-L3) e in diagnosi differenziale è stata considerata una forma degenerativa (mielopatia degenerativa).

Gli 8 campioni sono stati successivamente divisi in 2 gruppi (Tabella 1 e 2):

- Campioni senza alterazioni cerebellari (Gruppo di controllo)
- Campioni con alterazioni cerebellari (Gruppo patologici, PAT)

Caso n.	Razza	Sesso	Età	Patologia
1	Pastore Belga	M	12 a	Paraplegia da ernia discale
2	Labrador	F	10 a	Paraplegia da ernia discale
3	Setter Inglese	M	15 a	Incontinenza
4	Alano	M	2 a	Torsione intestinale

Tabella 1. Dati relativi ai soggetti del gruppo di controllo.

Caso n.	Razza	Sesso	Età	Patologia
1	5 Pastore Tedesco	M	2 mesi	Sindrome cerebellare
2	6 Meticcio	F	6 mesi	Sindrome da mutilazione acrale
3	7 Hovawart	F	11 a	Mielopatia degenerativa
4	8 Hovawart	M	9 a	Mielopatia degenerativa

Tabella 2. Dati relativi ai soggetti del gruppo PAT.

Campionamento dei Cervelletti

L'encefalo è stato immerso in paraformaldeide 4% in tampone fosfato (0.1 M, pH 7.2) (Sigma) per 48-62 ore a +4°C. Il campione è poi stato risciacquato con tre lavaggi in PBS 0,01% su agitatore e in seguito immerso in una soluzione di PBS 0,01%, saccarosio 30% e sodio azide 0,1% (+4°C). Successivamente è stato rimosso il cervelletto in toto; il verme del cervelletto è stato poi diviso sul piano mediano in due parti (Fig. 12): una metà è stata destinata al congelamento e l'altra metà all'inclusione in paraffina.

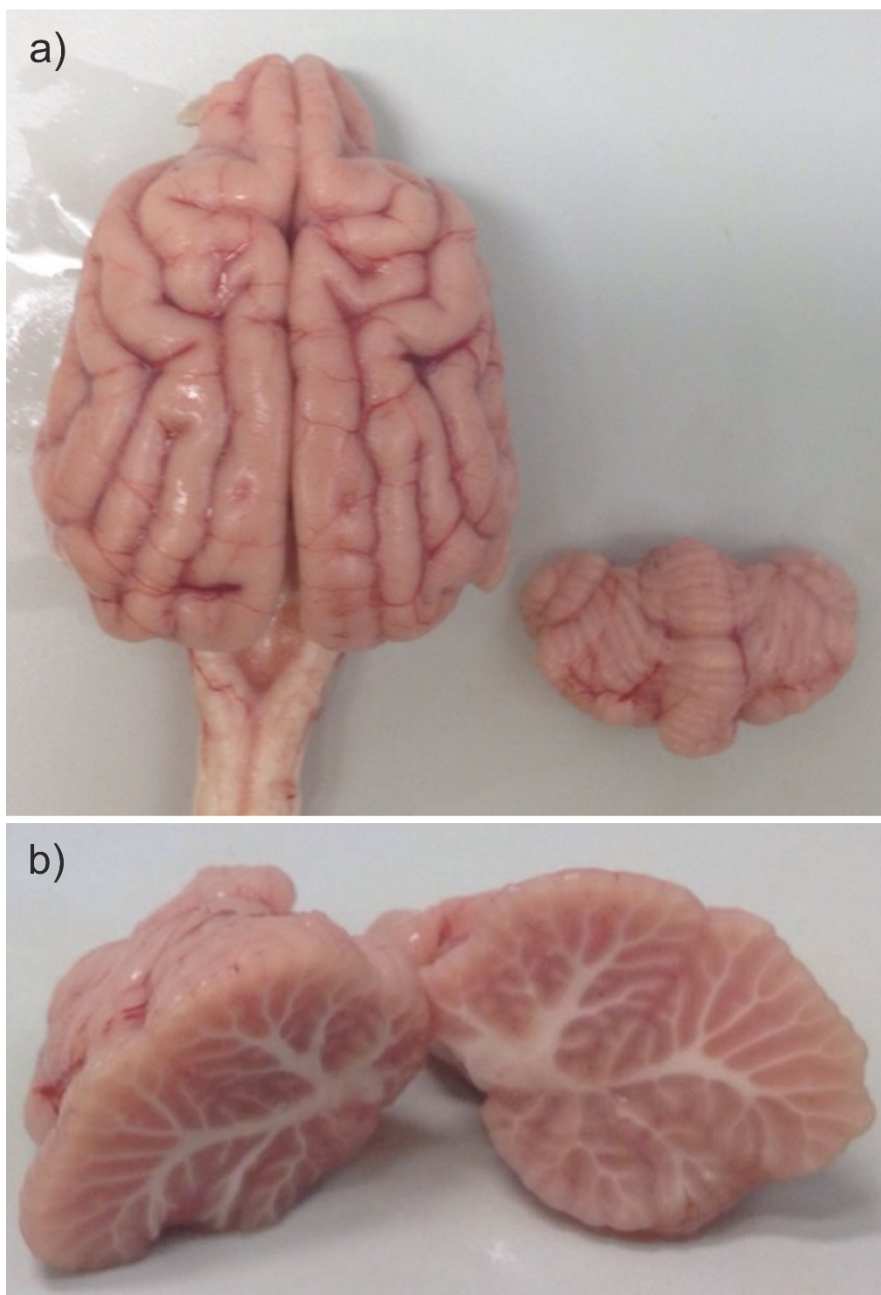


Figura 12: Fasi della preparazione dei tessuti del cane patologico (n. 2). a) Il cervelletto viene rimosso dal tronco encefalico; b) Il cervelletto viene tagliato sagittalmente; una parte viene processata per il congelamento e l'altra per l'inclusione in paraffina.

Congelamento

La parte di cervelletto destinata al congelamento è stata trasferita in una soluzione di PBS-saccarosio-azide e *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (Sakura Finetek Europe, Alphen

an den Rijn, The Netherlands) in rapporto 1:1 per altre 24 ore a +4°C ed in seguito immersa in OCT al 100% in cryomold (Sakura Finetek Europe). Il campione è stato quindi congelato utilizzando 2-metil-butano raffreddato in azoto liquido.

Da questi campioni, con l'utilizzo del criostato, sono state ottenute delle sezioni seriate sagittali di 16 µm di spessore, che sono state opportunamente montate su vetrini polilisinati. Successivamente, i vetrini così ottenuti, sono stati stoccati a -80°C per le successive analisi di immunistochemica.

Immunistochemica

Nel presente studio è stata utilizzata la metodica di immunofluorescenza indiretta.

I vetrini precedentemente preparati sono stati prelevati dal congelatore a -80°C, posti a temperatura ambiente per circa 10-15 minuti, poi le sezioni sono state delimitate con la Pap-Pen. I campioni sono stati quindi posti in camera umida e reidratati con PBS 0,01% per 5 minuti a temperatura ambiente. Rimosso il PBS, sono stati incubati con il blocco primario contenente siero normale di capra (Normal goat serum, NGS) al 20%, Triton-X al 0,5 % e tampone fosfato salino (PBS) allo 0,01%.

Le sezioni sono state quindi incubate *overnight* in camera umida a temperatura ambiente con l'anticorpo primario rabbit anti calbindina (Rb α Calb), NGS 20%, Triton 0,5%, diluiti in *antibody diluent*.

Il giorno seguente, in seguito a lavaggio in PBS 0,01% (3x10 minuti), i tessuti sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente in camera umida con l'anticorpo secondario Goat anti-rabbit IgG Fitc (Tabella 3).

Anticorpo	Specie Ospite	Codice siero	Diluizione	Fornitore
Rb α Calb	Coniglio	CB-38a	1:1000	Swant
NGS	Capra	S-1000	20%	Sigma
Goat anti-rabbit IgG Fitc	Capra	401314	1:200	Calbiochem- Novabiochem

Tabella 3. Specifiche dell'anticorpo primario e secondario; abbreviazioni: Calb, calbindina; FITC, isotiocianato di fluorescina; NGS, normal goat serum.

Le criosezioni sono state quindi lavate in PBS 0,01% (3x10 minuti) ed incubate per 25 minuti con NeuroTrace Blue (NT) (N 21479, Invitrogen) e nuovamente risciacquate con PBS 0,01% (3x10 minuti) ed infine ricoperte con *buffer glycerol* pH 8,6.

Le preparazioni sono state esaminate con un microscopio Nikon Eclipse (NI microscope) (Nikon instrument Europa BV, Amsterdam, Netherlands) con telecamera F/10 della Nikon (DS-Qi1Mc) ed ottica DS-Fi2, equipaggiato con appropriati filtri luce. Le immagini sono state acquisite con il software NIS Elements, Nikon Basic Research, BR 4.20.01.

Sono quindi state contate manualmente le CP con nucleo evidente, per ogni singola lamella di ogni singolo lobulo di tutti i lobi del verme cerebellare; inoltre sono stati valutati gli spessori dello strato dei granuli e dello strato molecolare, eseguendo tre misurazioni separate in ciascun lobo (Fig. 13).

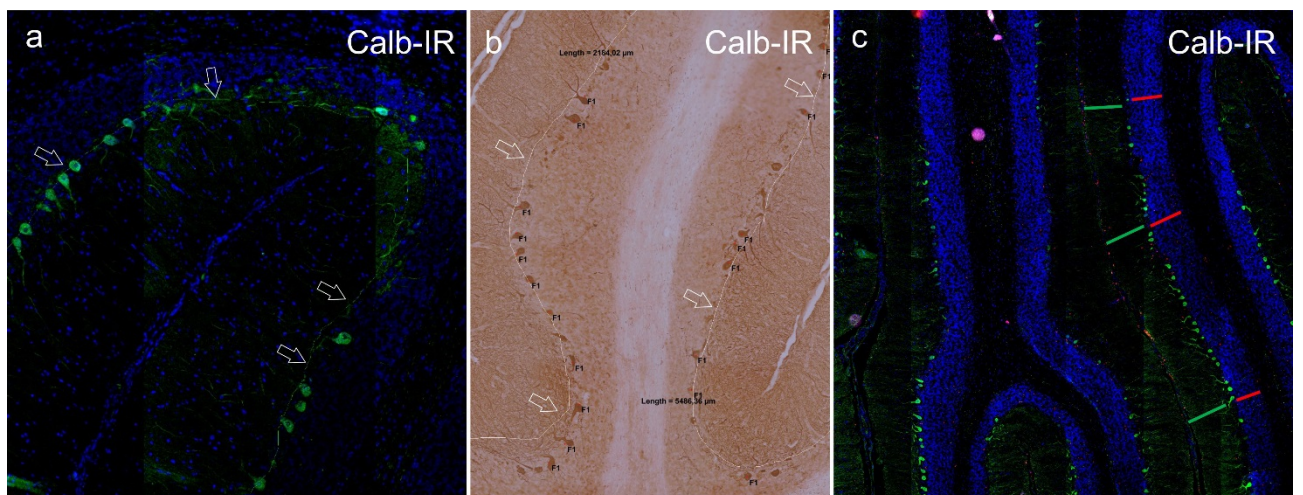


Fig. 13. Fotografie di sezioni del verme cerebellare di cane di controllo sottoposte a reazioni di immunofluorescenza (a, c) e immunoperossidasi (b) utilizzando l'anticorpo anti-calbindina (Calb). Il marcatore nucleare dapi (blue/viola) è stato utilizzato come marcatore nucleare (a, c). a, b) Una sottile linea tratteggiata (freccie) indica un tratto dello strato delle cellule di Purkinje sottoposte a conta. c) Lo spessore dello strato dei granuli (linee rosse) e dello strato molecolare (linee verdi) è stato misurato in tre punti disintinti della lamella.

Immunoenzimatica

In questo studio è stato utilizzata anche la tecnica dell'immunoperossidasi utilizzando il cromogeno 3,3-diaminobenzidina (DAB).

I vetrini precedentemente preparati, sono stati prelevati dal congelatore a -80°C , posti a temperatura ambiente per circa 10 minuti e poi sono stati eseguiti 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno in PBS 0,01%. Le sezioni sono state trattate con acqua ossigenata all'1% per 15 minuti. Sono seguiti 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con PBS 0,01%. Le sezioni sono state quindi incubate per 1 h con NGS al 20% e Triton-X al 0,5% in PBS 0,01% a temperatura ambiente. Successivamente sono state incubate *overnight* con anticorpo primario (Rb α Calb) diluito NGS 20% e Triton-X 0,5% in PBS 0,01% a $+4^{\circ}\text{C}$. Sono stati quindi effettuati i lavaggi (3x10 minuti) con PBS 0,01% e poi sono state incubate per 60 minuti con l'anticorpo secondario Go α Rb (H+L) biotinilato diluito in PBS 0,01%. Le sezioni, dopo ulteriori 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con PBS 0,01%, sono state incubate per 30 minuti nel complesso avidina-biotina, preparato almeno 30 minuti prima. Sono stati quindi eseguiti ulteriori 3 lavaggi da 10 minuti in PBS 0,01% e trattate le sezioni con la DAB (Vector Laboratories; SK-4100). In seguito sono stati effettuati 3 lavaggi consecutivi di 5 minuti ciascuno con PBS 0,01%, ed infine le sezioni sono state disidratate con etanolo a concentrazioni progressivamente crescenti dal 70 % al 100%. In ultimo è stata effettuata la chiarificazione con xilolo ed è stato coperto tutto con balsamo.

Inclusione in paraffina

I campioni, precedentemente stoccati in frigo a $+4^{\circ}\text{C}$ in PBS 0,01%, saccarosio 30% e sodio azide 0,1%, sono stati prelevati e trattati con etanolo a concentrazioni progressive dal 70 % al 100%.

Successivamente sono stati trattati con xilolo *overnight*. Il giorno dopo sono stati immersi in paraffina I (45°C - 50°C) *overnight*; il giorno successivo i campioni sono stati messi in paraffina II (58°C e 60°C) per minimo tre ore e poi sono stati posti negli appositi contenitori di acciaio e ricoperti con paraffina II liquida a RT. Quando i campioni si sono completamente solidificati, sono stati effettuati i tagli con il microtomo rotativo. Le sezioni così ottenute, di 6 μm , sono state tirate durante il taglio, con l'ausilio di una pinzetta, e quindi deposte su una goccia d'acqua distillata alla temperatura di circa 40 - 45°C , situata sul vetrino. Successivamente, prima di procedere alla deparaffinatura, i vetrini sono stati posti *overnight* in una stufa ad una temperatura appena sotto il punto di fusione della paraffina, ma comunque non superiore a 60°C .

Il giorno dopo, i vetrini sono stati prelevati dalla stufa e processati con la colorazione istologica ematossilina-eosina.

Ematossilina-Eosina

I vetrini sono stati sparaffinati immergendo i vetrini in xilolo per almeno 15 minuti. E' quindi stata effettuata la reidratazione attraverso il passaggio dei tessuti in una serie di alcoli a concentrazione progressivamente decrescente, dal 100% al 50% per circa 1 minuto a passaggio. Successivamente sono stati effettuati lavaggi in acqua distillata per 30 secondi e poi è stato utilizzato Emallume di Mayer per 7-8 minuti con successivo risciacquo, prima con acqua corrente, cambiandola 2-3 volte, per 10 minuti, poi con acqua distillata. In seguito i campioni sono stati trattati con eosina 1% per 30 secondi, e poi con alcool a concentrazioni crescenti. Le procedure sono state molto veloci, circa 30 secondi, per gli alcool a concentrazioni minori (50%-70%-80%), dato che sottraggono l'eosina molto rapidamente, mentre per gli alcool a concentrazioni maggiori (90%-95%-100%) sono state più lente, circa 2 minuti. In ultimo è stata effettuata la chiarificazione con xilolo ed è stato coperto tutto con balsamo.

Risultati

In tutti i campioni analizzati è stata evidenziata un'intensa immunoreattività alla calbindina (CALB-IR) a carico del pirenoforo e dei processi dendritici di tutte le CP (Fig. 14).

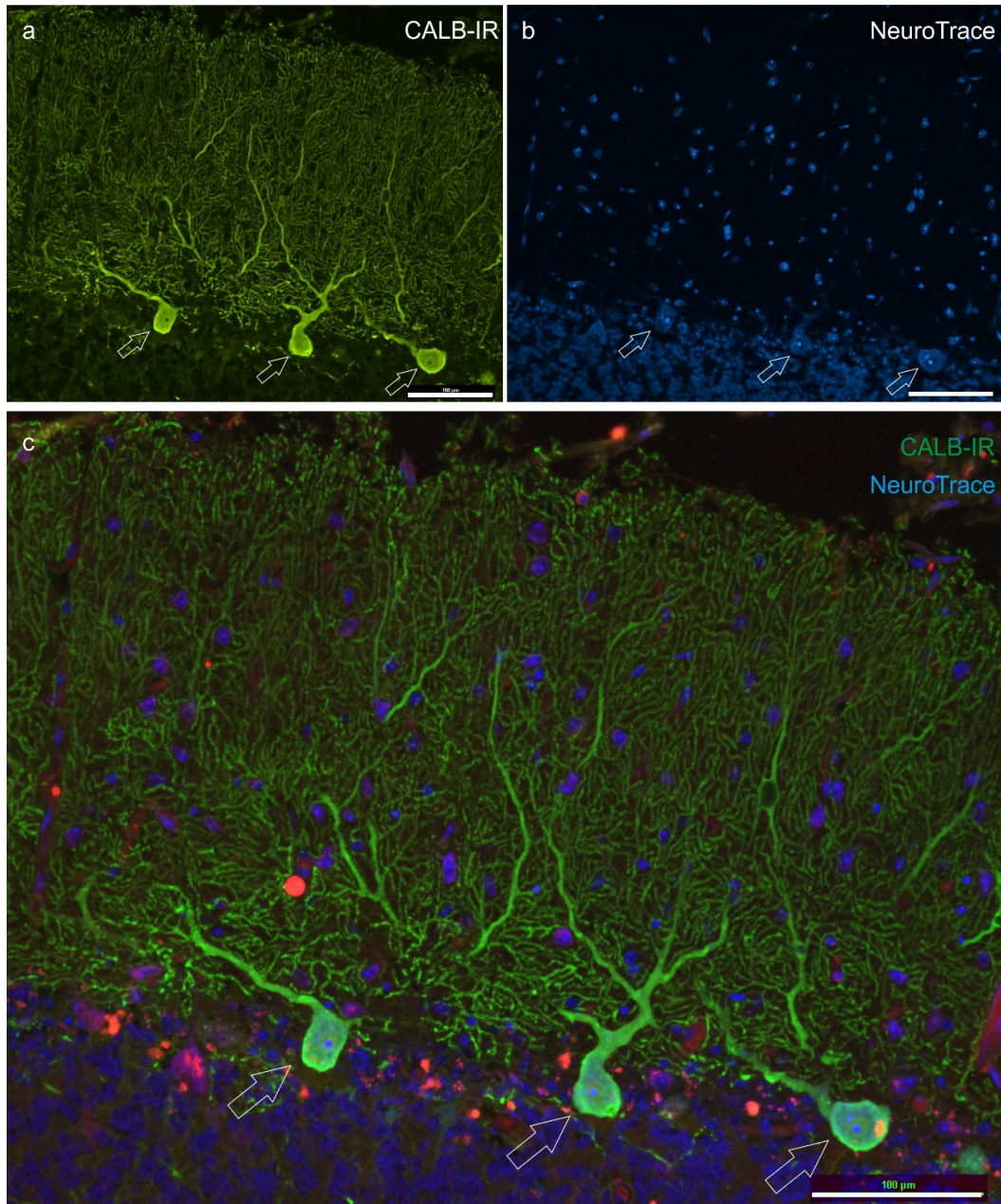


Fig. 13: a-c) Sezione criostatica di corteccia cerebellare di cane (soggetto di controllo n. 1); il tessuto è stato sottoposto a reazione di immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo anti-calbindina (CALB), che marca sia il pirenoforo che i processi dendritici di queste cellule. Le frecce indicano tre cellule del Purkinje immunoreattive alla calbindina (CALB-IR) (a) che si possono identificare anche grazie al marcatore NeuroTrace® (b). c) immagine sovrapposta (merge). Si possono notare, in questa figura, alcuni pigmenti (frequenti nel sistema nervoso dei cani anziani) marcati in rosso. Barra= 100 micrometri

Cani di controllo

I campioni del gruppo di controllo sono stati tre soggetti anziani ed un soggetto giovane adulto. In tutti i soggetti anziani (controlli n. 1-2-3) la conta delle CP (in totale sono state contate 7048 cellule) per il totale dei lobi analizzati in tutti i soggetti (1517,58 mm lineari complessivi) (tabella 4) ha dato una media generale di $5,23 \pm 0,18$ cell/mm. L'osservazione di tutti i lobi del verme cerebellare ha permesso di evidenziare una diversa distribuzione delle CP lungo i diversi tratti di una stessa lamella in tutti soggetti anziani di controllo. Suddividendo idealmente la singola lamella in parte esterna, parte media e parte interna, è stata riscontrata una maggiore densità di neuroni CALB-IR nelle parti periferiche delle singole lamelle: procedendo verso la parte centrale vi era una netta e progressiva diminuzione del numero delle cellule, fino alla totale scomparsa per lunghi tratti (Fig. 14; Fig. 15).

La valutazione dello spessore dello strato dei granuli della corteccia cerebellare ha fornito una media generale di $200,99 \pm 9,61$ μm , mentre la valutazione dello spessore dello strato molecolare ha fornito una media generale di $321,26 \pm 4,36$ μm .

Nel soggetto giovane adulto (controllo n. 4) la conta totale delle CP (2111 cell) per il totale dei lobi analizzati (1175,77 mm lineari) ha dato una media di $2,22 \pm 0,97$ cell/mm (tabella 4). La distribuzione delle CP era omogenea senza distinzioni tra i vari tratti delle singole lamelle. La valutazione dello spessore dello strato granulare ha fornito una media generale di $318,19 \pm 13,85$ μm , mentre la valutazione dello spessore dello strato molecolare della corteccia cerebellare ha fornito una media di $722,26 \pm 31,51$ μm .

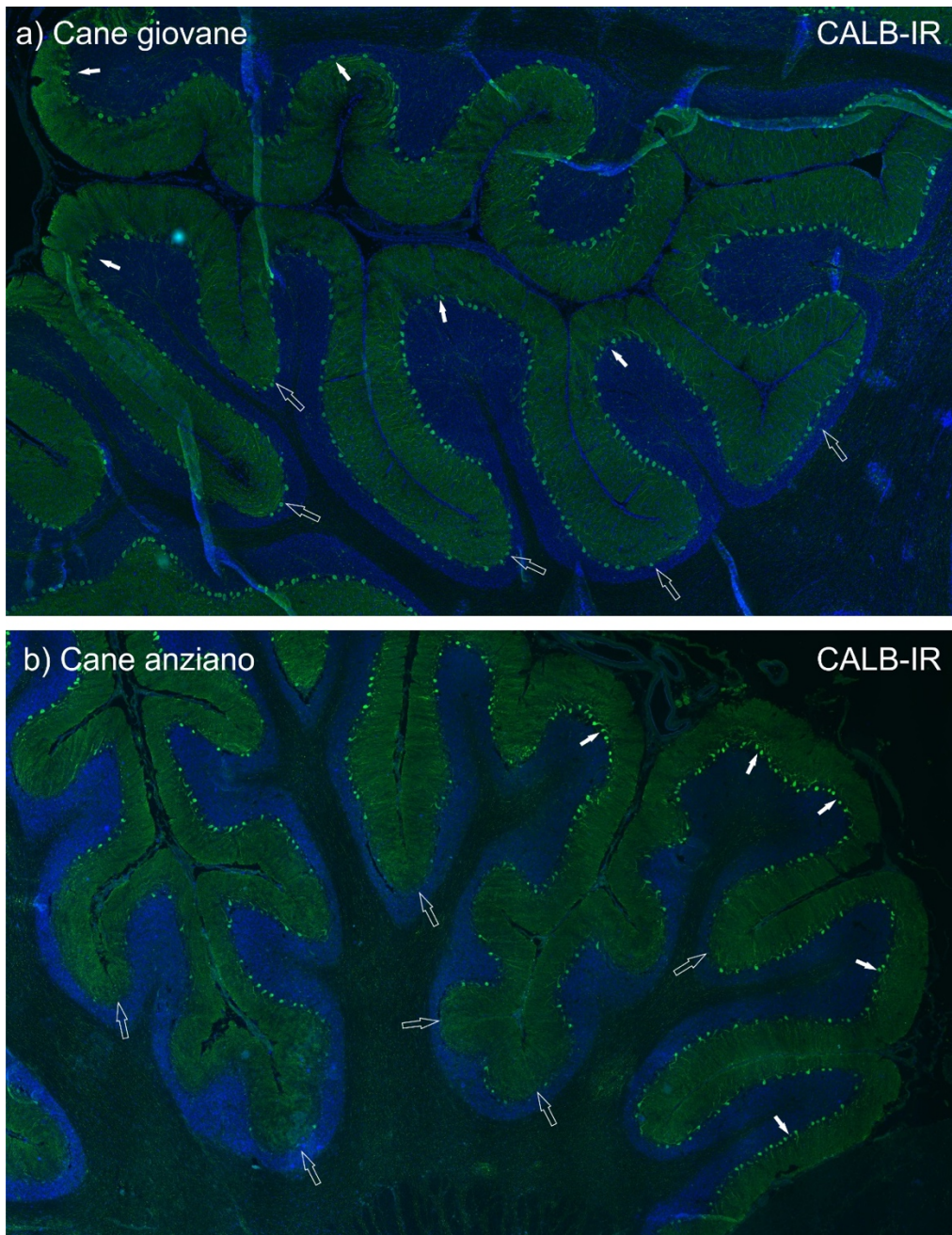


Fig. 14. a-b) Sezioni criostatiche di corteccia cerebellare di cane (soggetto di controllo giovane e soggetto di controllo anziano); i tessuti sono stati sottoposti a reazioni di immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo anti-calbindina (CALB); lo sfondo blue è dovuto all'utilizzo del marcatore NeuroTrace®, che marca in particolar modo lo strato dei granuli. Le frecce bianche indicano le parti periferiche delle lamelle, in cui le cellule del Purkinje sono ben rappresentate sia nel soggetto giovane che in quello anziano. Al contrario, nelle parti più interne delle lamelle, le cellule del Purkinje sono molto meno rappresentate nel cane anziano rispetto a quello giovane (frecce vuote).

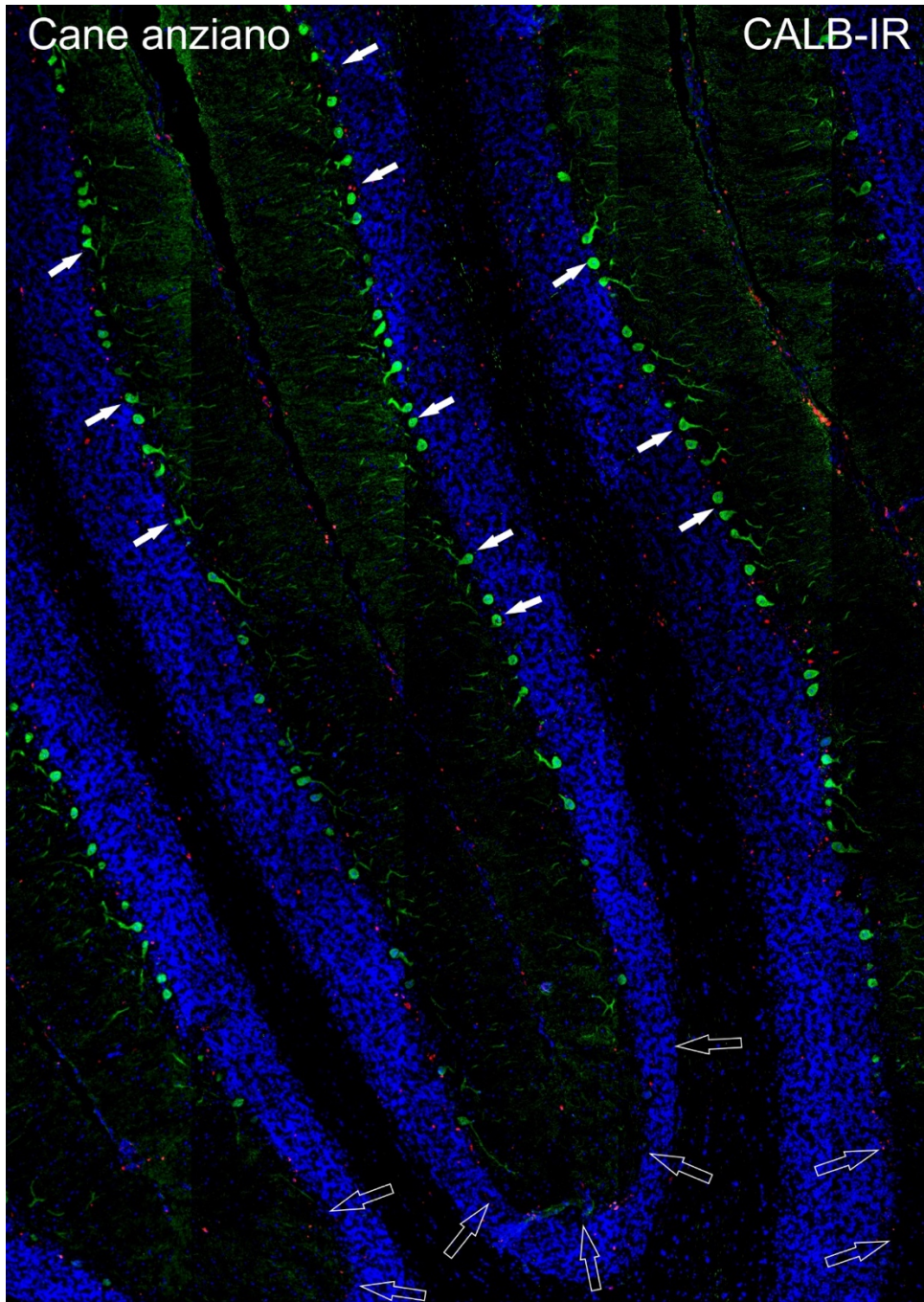


Fig. 15. Sezione criostatica di corteccia cerebellare di cane di controllo anziano (n.1); il tessuto è stato sottoposto a reazione di immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo anti-calbindina (CALB); lo sfondo blue è dovuto all'utilizzo del marcatore NeuroTrace®, che marca in particolar modo lo strato dei granuli. Le frecce bianche indicano le parti centrali delle lamelle, in cui le cellule del Purkinje sono ben rappresentate anche nel soggetto anziano. Al contrario, nelle parti più interne delle lamelle, le cellule del Purkinje sono molto meno rappresentate (frecce vuote), così come sono meno marcati i processi dendritici CALB-IR nello strato molecolare.

Caso n.	Razza	Patologia	Lunghezza Totale in mm lineari	CP Totali	CP/mm
1	Pastore Belga	Ernia discale T-L	249,28	1252	5,33±0,97
2	Labrador	Ernia Discale T-L	389,99	1872	4,80±0,95
3	Setter I	Incontinenza	360,78	1855	5,31±1,16
4	Alano	Torsione intestinale	1175,78	2111	2,22±0,97

Tabella 4. Media delle CP per il totale in mm lineari in ogni singolo soggetto di controllo

Caso n.	1° Lob. Ant: Lingula	2° Lob. Ant: Lobulo centrale	3° Lob. Ant: Culmen	1° Lob. Post: Nodulo flocculo nodulare	2° Lob. Post: Uvula	3° Lob. Post: Piramide del Verme	4° Lob. Post: Declive, Folium, Tuber
1	mm: 18,99 CP: 119 CP/mm: 6,48±2,84	mm: 24,73 CP: 161 CP/mm: 6,62±1,10	mm: 30,95 CP: 157 CP/mm: 5,17±1,66	mm: 10,55 CP: 54 CP/mm: 5,67±2,41	mm: 26,22 CP: 110 CP/mm: 4,20±0,64	mm: 30,43 CP: 133 CP/mm: 4,23±1,65	mm: 107,40 CP: 518 CP/mm: 4,96±2,29
2	mm: 35,10 CP: 151 CP/mm: 4,23±1,87	mm: 37,10 CP: 143 CP/mm: 3,82±1,21	mm: 147,38 CP: 720 CP/mm: 5,02±2,39	mm: 4,68 CP: 29 CP/mm: 6,20±0,38	mm: 36,51 CP: 231 CP/mm: 6,31±1,61	mm: 40,09 CP: 175 CP/mm: 4,53±1,62	mm: 89,13 CP: 423 CP/mm: 5,10±2,69
3	mm: 50,60 CP: 323 CP/mm: 6,75±1,88	mm: 19,90 CP: 109 CP/mm: 5,44±0,94	mm: 99,14 CP: 622 CP/mm: 6,47±1,17	mm: 15,66 CP: 95 CP/mm: 6,23±2,32	mm: 33,89 CP: 141 CP/mm: 4,46±1,91	mm: 34,16 CP: 148 CP/mm: 4,24±1,12	mm: 107,43 CP: 417 CP/mm: 3,84±1,04
4	mm: 200,13 CP: 277 CP/mm: 1,36±0,51	mm: 109,66 CP: 261 CP/mm: 2,84±1,45	mm: 293,37 CP: 554 CP/mm: 2,16±1,09	mm: 31,79 CP: 123 CP/mm: 4,13±1,94	mm: 123,96 CP: 225 CP/mm: 1,85±0,61	mm: 87,76 CP: 126 CP/mm: 1,42±0,43	mm: 329,10 CP: 545 CP/mm: 1,81±1,18

Tabella 5. Numero delle cellule del Purkinje nei singoli lobi dei soggetti controllo.

Cani patologici

I campioni del gruppo patologici erano rappresentati da due soggetti cuccioli e due anziani.

Nel cucciolo di Pastore Tedesco (PAT n. 1) la conta totale delle CP (1779 cell) per il totale dei lobi analizzati (241,60 mm lineari) ha dato una media generale di 7,53±1,16 cell/mm (tabella 6); nell'uvula e nel culmen, ad esempio, sono state contate rispettivamente 9,15±1,65 e

7,11±2,18 cellule su millimetro lineare (tabella 7). La distribuzione delle CP lungo i tratti di tutte le lamelle era omogenea.

La valutazione degli spessori dello strato granulare della corteccia cerebellare ha fornito una media generale di 189,85 µm, mentre la valutazione degli spessori dello strato molecolare della corteccia cerebellare ha fornito una media generale di 309,70 µm.

Nell'altro soggetto cucciolo (PAT n. 2) la conta totale delle CP (contate in totale 700 cellule in 302,12 mm lineari) per il totale dei lobi analizzati ha fornito una media generale del numero totale delle CP di 2,33±0,37 cell/mm (tabella 6), con ad esempio nel lobulo centrale una media di 1,95±0,48 cell/mm e nella lingula una media di 2,24±0,34 cell/mm (tabella 7). La distribuzione delle CP era omogenea. La misurazione dello strato dei granuli ha dato una media di 344,08±11,18 µm, mentre la valutazione degli spessori dello strato molecolare ha fornito una media di 442,29±9,95 µm.

Nei due soggetti anziani patologici (PAT. n. 3-4) la conta delle CP (in totale sono state contate 2089 cellule) per il totale dei lobi analizzati in entrambi i soggetti (517,48 mm lineari complessivi) (tabella 6) ha dato una media generale di 4,39±0,64 cell/mm. La distribuzione delle CP era uniforme e costante lungo tutto lo strato di ciascuna lamina. La valutazione dello spessore dello strato granulare ha dato una media di 247,41±9,61 µm, mentre la valutazione dello spessore dello strato molecolare ha fornito una media di 327,29±3,50 µm.

Caso n.	Razza	Patologia	Lunghezza Totale in mm lineari	CP Totali	CP/mm
1	Pastore T.	Sospetta Abiotrofia Cerebellare	241,60	1779	7,53±1,16
2	Meticcio	Mutilazione acrale	302,12	700	2,33±0,37
3	Hovawart "A"	Mielopatia degenerativa	480,48	1913	3,93±0,91
4	Hovawart "B"	Mielopatia degenerativa	37,06	176	4,7±1,23

Tabella 6. Media delle CP per il totale in mm lineari in ogni singolo soggetto patologico

Caso n.	1° Lob. Ant: Lingula	2° Lob. Ant: Lobulo centrale	3° Lob. Ant: Culmen	1° Lob. Post: Nodulo flocculo nodulare	2° Lob. Post: Uvula	3° Lob. Post: Piramide del Verme	4° Lob. Post: Declive, Folium, Tuber
1	Non Valutabile	mm: 27,06 CP: 227 CP/mm: 8,09±2,93	mm: 83,24 CP: 560 CP/mm: 7,11±2,18	Non Valutabile	mm: 12,72 CP: 116 CP/mm: 9,15±1,65	mm: 16,63 CP: 112 CP/mm: 7,54±3,20	mm: 101,95 CP: 764 CP/mm: 7,53±2,39
2	mm: 39,25 CP: 87 CP/mm: 2,24±0,34	mm: 89,77 CP: 176 CP/mm: 1,95±0,48	Non Valutabile	mm: 20,57 CP: 59 CP/mm: 2,83±0,50	mm: 112,61 CP: 281 CP/mm: 2,68±0,73	mm: 39,91 CP: 97 CP/mm: 2,27±0,94	Non Valutabile
3	mm: 74,50 CP: 299 CP/mm: 4,62±2,30	mm: 51,40 CP: 118 CP/mm: 2,29±0,92	mm: 128,79 CP: 601 CP/mm: 4,72±1,49	mm: 18,61 CP: 83 CP/mm: 4,48±1,12	mm: 40,27 CP: 141 CP/mm: 3,52±1,26	mm: 59,16 CP: 195 CP/mm: 3,34±1,08	mm: 107,73 CP: 476 CP/mm: 4,54±2,08
4	Non valutabile	Non valutabile	Non valutabile	mm: 7,84 CP: 49 CP/mm: 6,20±1,52	mm: 6,50 CP: 30 CP/mm: 4,72±1,15	mm: 8,70 CP: 26 CP/mm: 3,23±1,65	mm: 14,02 CP: 71 CP/mm: 5,21±1,63

Tabella 7. Numero delle cellule del Purkinje nei singoli lobi dei soggetti PAT

Discussione

I dati riscontrati in questo studio hanno permesso di considerare la tecnica di immunofluorescenza su tessuti congelati preferibile alle altre tecniche più classicamente riportate in letteratura per la valutazione quantitativa delle CP, in quanto l'intensa CALB-IR di tutte le CP generava una migliore risoluzione d'immagine, particolarmente evidente in tessuti ottimamente fissati e conservati.

La conta cellulare lungo tutta la lunghezza dello strato delle CP ha consentito di ottenere in generale un dato preciso con una bassa deviazione standard.

Nei soggetti anziani del gruppo di controllo (controlli n. 1-2-3), la media complessiva delle CP è stata leggermente più alta (media generale di $5,24 \pm 0,18$ cell/mm) e con valori più costanti (da $4,80 \pm 0,95$ a $5,33 \pm 0,97$ cell/mm) rispetto a quanto documentato da Pugliese nel 2007 in un analogo campione di soggetti della medesima fascia di età (media generale di $3,75 \pm 1,29$ cell/mm con valori variabili da $2 \pm 1,0$ a $5 \pm 1,1$ cell/mm). Questo è verosimilmente riconducibile ad una maggiore precisione ed attendibilità dei dati riscontrabili con la metodica utilizzata nel presente progetto di ricerca, in cui sono stati valutati diversi millimetri lineari (nei tre soggetti anziani una media di 333 mm di tessuto cerebellare a soggetto), rispetto alle metodiche d'indagine riportate in letteratura, dove si considerano solo alcuni μm di tessuto.

La particolare distribuzione non omogenea delle CP lungo i vari tratti di ogni singola lamina evidenziata in tutti e tre i soggetti anziani di controllo, ha posto un interessante quesito in merito alla sua interpretazione. Dato che nel corso degli anni è stata dimostrata in diversi tessuti nervosi la presenza di cellule con caratteristiche di germinalità o non completa differenziazione (Wozniak, 1998; Keys, 1999), sarebbe interessante approfondire anche nel cervelletto lo studio della plasticità neuronale con marcatori del grado di differenziazione.

La valutazione dello spessore dello strato granulare ha fornito dati conformi ($200,99 \pm 9,61$ μm) a quanto riportato in bibliografia da Phemister nel 1968 (media di 200 μm) e da Tatalick nel 1993 (296 μm), mentre la misurazione dello strato molecolare ha fornito un valore medio minore ($321,26 \pm 4,36$ μm) rispetto a quanto riportato in letteratura sempre

da Phemister nel 1968 (media di 450 μm) e da Tatalick nel 1993 (480,8 μm). Questa discordanza di dati relativamente allo strato molecolare è stata riscontrata in quasi tutti i campioni, sia di controllo che patologici, analizzati nel presente progetto di ricerca. Questo può essere interpretato come un possibile errore nella metodica di valutazione di questo specifico strato, o invece, data l'omogeneità delle medie rilevate nei campioni di questo progetto, un dato più veritiero rispetto a quanto riportato in letteratura.

L'analisi quantitativa delle CP del caso di controllo n. 4 (Alano di 2 anni) ha fornito dati molto discordanti rispetto a quanto atteso. Trattandosi di un soggetto giovane adulto, che non aveva manifestato sintomi riferibili problematiche neurologiche, era verosimile aspettarsi una media complessiva delle CP sicuramente superiore a quanto riscontrato nei soggetti anziani di controllo e conforme al dato riportato da Pugliese (2007) relativo ad un soggetto della medesima fascia di età ($6 \pm 1,6$ cell/mm). Questo potrebbe essere interpretato in diversi modi: possibili errori nella processazione del campione in una qualunque delle fasi di lavoro; precoce invecchiamento, riconducibile alla minore longevità specifica della razza paragonata alle altre razze (6–8 anni contro i 10-12 del setter inglese e del labrador o i 10-14 del pastore belga); peculiarità anatomica specifica della razza o di quel soggetto in particolare. La mancanza di altri campioni riferibili alla stessa razza ed alla stessa fascia di età, non hanno permesso un'analisi statisticamente significativa.

La valutazione degli strati della corteccia cerebellare ha fornito medie più alte sia dello strato dei granuli ($318,97 \pm 13,8$ μm) che dello strato molecolare ($722,6 \pm 31,5$ μm), rispetto agli altri campioni analizzati e a quanto riportato in letteratura (Phemister et al, 1968; Tatalick et al., 1993). Questo è verosimilmente compatibile con le dimensioni morfologiche dell'animale trattandosi specificatamente di un Alano.

Nel caso PAT n. 1 (cucciolo di Pastore Tedesco), il numero complessivo di CP è leggermente superiore (media di $7,53 \pm 1,1$ cell/mm) a quanto riportato in letteratura da Nibe nel 2007 ($6,1 \pm 1,3$ cell/mm). Anche in questo caso è verosimilmente riconducibile ad una maggiore precisione ed attendibilità dei dati riscontrabili con la metodica utilizzata nel presente progetto di ricerca.

La valutazione dello spessore dello strato granulare ha fornito una media leggermente inferiore ($189,85 \pm 2,9$ μm) alla media riportata in bibliografia (Phemister et al, 1968; Tatalick et al., 1993) e alla media riscontrata nel presente progetto di ricerca, in generale

in tutti gli altri campioni analizzati. Anche in questo caso è possibile considerare un eventuale errore di analisi ma, trattandosi di un soggetto patologico che aveva presentato sintomatologia neurologica riferibile ad una problematica cerebellare di possibile natura degenerativa, è anche possibile ipotizzare una possibile abiotrofia cerebellare granulopriva, sebbene in letteratura (Tatalick et al., 1993; Huska et al., 2013) siano riportati valori più bassi (da 47 μm a 180 μm). Anche la valutazione dello strato molecolare ha fornito un indice minore (309,70 \pm 5,74 μm) rispetto alla letteratura ma conforme a quanto rilevato nei nostri campioni.

Il caso PAT n. 2 (meticcio di 6 mesi) ha presentato una media delle CP molto bassa (2,33 \pm 0,37 cell/mm) rispetto a quanto riportato in letteratura (Nibe et al., 2007) e a quanto rilevato nell'altro soggetto cucciolo patologico (PAT n. 1) e quindi a quanto atteso. Il soggetto clinicamente presentava deficit compatibili con una polineuropatia sensoriale, in quanto manifestava lesioni da automutilazione a carico della porzione distale degli arti, particolarmente degli arti pelvici, con assenza di nocicezione all'estremità distale degli arti pelvici, dubbia negli toracici (sindrome da mutilazione acrale); la neurolocalizzazione clinica è stata quindi riferita al sistema nervoso periferico ed il principale sospetto diagnostico è stato di una polineuropatia sensoriale di origine genetica. Le polineuropatie sensoriali su base genetica, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, sono un eterogeneo gruppo di patologie rare in cui si verifica una degenerazione neuronale con diminuzione delle dimensioni dei gangli spinali dovuta a perdita dei neuroni fino anche al 50%, ed una minore densità assonale, prevalentemente a livello di fascicolo midollare dorsolaterale (Cummings et al., 1983; Coates et al., 2004; Auer-Grumbach, 2006,2008; Jaderlund et al., 2007; Granger, 2010; de Lahunta, 2010; Bardagí et al, 2011); Anche in questo caso, quindi, è ipotizzabile una diretta correlazione tra i dati che sono stati riscontrati e la polineuropatia sensoriale di cui il soggetto era affetto, per diretta compromissione dei fasci spinocerebellari e di conseguenza anche dei neuroni della corteccia cerebellare su cui questi fasci terminano, sebbene al momento in letteratura veterinaria non siano riportati dati simili. Inoltre in medicina umana sono riportati due *case-report* (Fukuhara et al. 1995; Sekijima et al., 1998) in cui sono stati documentati 11 casi di neuropatia sensoriale ereditaria associata ad atrofia cerebellare (HMSNCA).

La valutazione dello strato granulare ha dato una media più alta ($344,08 \pm 11,18 \mu\text{m}$) rispetto alla letteratura, mentre la valutazione dello strato molecolare ha fornito una media più conforme alla letteratura ($442,29 \pm 9,95 \mu\text{m}$).

Nei due soggetti anziani del gruppo patologici (PAT n. 3-4) la media complessiva delle CP leggermente più bassa (media generale di $4,39 \pm 0,64 \text{ cell/mm}$) rispetto ai soggetti anziani del gruppo di controllo ma comunque più alta rispetto a quanto documentato da Pugliese nel 2007 in un analogo campione di soggetti della medesima fascia di età (media generale di $3,75 \pm 1,29 \text{ cell/mm}$), potrebbe essere interpretato come un dato più preciso ed attendibile rispetto a quanto riportato in letteratura, in soggetti con una diminuzione patologica delle CP. Questo dato, unitamente alla distribuzione omogenea delle CP lungo tutti i tratti delle singole lamelle, ha posto diverse interpretazioni. Sebbene i due soggetti appartengano alla stessa razza e alla stessa linea genetica (madre e figlio), e sia quindi possibile ipotizzare una possibile correlazione tra quanto riscontrato e possibili differenze su base genetica legate alla razza o alla specifica linea familiare, non si può non considerare che entrambi i soggetti erano affetti da mielopatia degenerativa. La mielopatia degenerativa è una patologia neurodegenerativa progressiva che clinicamente si manifesta tipicamente con gravi deficit degli arti pelvici, quali marcata atassia e deficit propriocettivi, e con riflessi spinali nella norma, portando quindi ad una neurolocalizzazione clinica a livello di midollo spinale toraco-lombare (T3-L3) (Dewey 2008; Awano et al., 2009; Bernardini, 2010; Zeng et al., 2014;). In realtà è una patologia che coinvolge diverse strutture in tutto sistema nervoso centrale: istologicamente è stata riscontrata una degenerazione assonale con demielinizzazione, gliosi e perdita neuronale nei fasci dorsolaterali del cordone laterale del midollo spinale, non solo a livello di midollo spinale toraco-lombare, che comunque è il maggiormente interessato, ma anche nei tratti midollari cervicali e lombo-sacrali (Kathmann et al., 2006; Mandara et al., 2011; Ogawa et al., 2011; Zeng et al., 2014), oltre che a livello di peduncoli cerebellari, nucleo rosso, nucleo dentato e nucleo vestibolare laterale (Johnston et al., 2000; Kathmann et al., 2006; Mandara et al., 2011). E' quindi ipotizzabile una diretta correlazione tra i dati riscontrati nel nostro studio e la mielopatia degenerativa di cui i pazienti erano affetti per diretta compromissione dei fasci spinocerebellari e conseguente degenerazione dei neuroni della corteccia cerebellare su cui questi fasci terminano. E' però possibile prendere in considerazione anche altri possibili meccanismi. La mielopatia degenerativa è una

patologia la cui eziopatogenesi a tutt'oggi non è ancora chiarita del tutto: sono state avanzate diverse ipotesi, tra cui cause immunologiche, metaboliche e genetiche (Bernardini, 2010; Ogawa et al., 2011). Negli ultimi anni è stata dimostrata una correlazione tra la mielopatia degenerativa e mutazioni genetiche della proteina superossido dismutasi 1 (SOD1) (Awano et al., 2009; Ogawa et al., 2011; Holder et al., 2014; Zeng et al., 2014). Questo dato rispecchia quanto riscontrato in pazienti umani affetti da sclerosi amiotrofica laterale (SLA) in cui la mutazione della SOD1 è presente in circa il 20% dei pazienti con SLA familiare e dal 1% al 5% dei pazienti con SLA sporadica (Awano et al., 2009; Kaur et al., 2016; Hayashi et al., 2016;); questa similitudine, unitamente alla corrispondenza dei dati sia clinici che anatomopatologici, ha portato a considerare la mielopatia degenerativa come modello animale della SLA dell'uomo (Awano et al., 2009; Morgan et al., 2013; 2014;). Gli studi più recenti in medicina umana sulle patologie neurodegenerative hanno dimostrato come in queste forme giochi un ruolo fondamentale anche l'eccesso di glutammato a livello di cellule neuronali come causa di citotossicità e conseguente degenerazione e perdita neuronale. In corso di SLA questo accumulo di glutammato è stato riscontrato prevalentemente a livello di motoneuroni, mentre in corso di atassia spinocerebellare 5 (SCA5), altra patologia neurodegenerativa, l'accumulo di glutammato è stato riscontrato prevalentemente a livello delle CP. La citotossicità da glutammato è riportata anche in molte altre problematiche neurologiche quali ischemie cerebrali, stati epilettici, lesioni traumatiche sia cerebrali che midollari (Lewerenz et al., 2015); in un articolo del 1999 (Olby et al.) è stato documentato un aumento delle concentrazioni di glutammato nel liquido cerebrospinale (CSF) lombare di cani affetti da grave ed acuta patologia compressiva del midollo spinale da ernia discale, ed una diretta correlazione tra la gravità della sintomatologia neurologica ed i livelli di glutammato. Inoltre nella SCA5 è stata identificata anche una mutazione del gene che codifica per una determinata proteina, la β -III spectrina, la cui assenza o diminuzione, oltre ad alterare il normale trasporto del glutammato, altera anche la normale morfologia delle CP, diminuendo il numero e la lunghezza delle ramificazione dei loro prolungamenti dendritici, provocando nel tempo una progressiva perdita neuronale (Kurihara et al., 1997; Perkins et al., 2010; Gao et al., 2011). Correlando quindi i nostri dati con quanto riportato in letteratura, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, è possibile ipotizzare che anche in corso di mielopatia

degenerativa vi siano delle mutazioni, su base genetica, di determinate proteine che comportino sia un accumulo intracellulare di mediatori chimici quali il glutammato, che un'alterazione diretta della normale morfologia delle CP con conseguente degenerazione e perdita neuronale. Saranno ovviamente necessari ulteriori studi per poter verificare la veridicità di tale ipotesi.

La valutazione delle medie degli spessori della corteccia cerebellare, sia dello strato dei granuli che dello strato molecolare, ha fornito dati conformi a quanto riscontrato nei soggetti anziani di controllo.

Bibliografia

- Alvarez MI, Lacruz C, Toledano-Díaz A, et al: Calretinin-immunopositive cells and fibers in the cerebellar cortex of normal sheep. *Cerebellum*. 2008; 7(3):417-29.
- Auer-Grumbach M, Mauko B, Auer-Grumbach P: Molecular Genetics of Hereditary Sensory Neuropathies. *Neuro Molecular Medicine*, 2006;8(1-2):147-58.
- Auer-Grumbach M: Hereditary sensory neuropathy type I. *Handbook of Clinical Neurology*, 2013; 115:893-906.
- Awano T, Johnson GS, Wade CM, et al: Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009 Feb 24;106(8):2794-9
- Axelrad JE, Louis ED, Honig LS, et al: Reduced Purkinje cell number in essential tremor: a postmortem study. *Archives of neurology*, 2008 Jan; 65 (1): 101-107.
- Babji R, Lee M, Cortes E, et al: Purkinje cell axonal anatomy: quantifying morphometric changes in essential tremor versus control brains. *Brain*, 136(Pt 10):3051-3061, 2013
- Bardagí M, Montoliu P, Ferrer L, et al: Acral mutilation syndrome in a miniature pinscher. *Journal of Comparative Pathology*. 2011 Feb-Apr; 144(2-3):235-8.
- Barone R, Bortolami R: *Anatomia Comparata dei Mammiferi Domestici*. 2006
- Bartschat S, Fieguth A, Könemann J, et al: Indicators for acute hypoxia: an immunohistochemical investigation in cerebellar Purkinje-cells. *Forensic Science International*, 2012 Nov 30;223(1-3):165-70
- Bernardini M: *Neurologia del Cane e del Gatto*; Poletto, II ed., 2010
- Bortolami R, Callegari E: *Anatomia e fisiologia degli animali domestici*. 2009
- Cantile C, Salvadori C, Modenato M, et al: Cerebellar granulo-prival degeneration in an Italian hound. *Journal of veterinary medicine*. 2002 Dec; 49(10):523-5.

Castagna C, Aimar P, Alasia S, et al: Post-natal development of the Reeler mouse cerebellum: An ultrastructural study. *Annals Anatomy*, 196(4):224-235, 2014

Choi JH, Lee CH, Yoo KY, et al: Age-related changes in calbindin-D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the dog main olfactory bulb. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2010 Jan; 30(1):1-12.

Coates JR, March PA, Oglesbee M: Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2007 Nov-Dec; 21(6):1323-31.

Coates JR, O'Brien DP: Inherited peripheral neuropathies in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal practice*, 34 (2004) 1361–1401

Cummings JF, de Lahunta A, Braund KG, et al: Hereditary sensory neuropathy. Nociceptive loss and acral mutilation in pointer dogs: canine hereditary sensory neuropathy. *American Journal of Pathology*, 1983 Jul;112(1):136-8.

De Lahunta A, Glass E: *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. Saunders, III ed., 2009

Dewey CW: *A Practical Guide to Canine and Feline Neurology*. Wiley-Blackwell, II ed., 2008

Diaz JV, Duque C, Geisel R: Neuroaxonal dystrophy in dogs: case report in 2 litters of Papillon puppies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2007 May-Jun; 21:531-534.

Dougherty SE, Reeves JL, Lucas EK, et al: Disruption of Purkinje cell function prior to huntingtin accumulation and cell loss in an animal model of Huntington disease. *Experimental Neurology*. 236(1):171-178, 2012

Dusart I, Morel MP, Wehrle R, et al: Late axonal sprouting of injured Purkinje cells and its temporal correlation with permissive changes in the glial scar. *Journal of Comparative Neurology*, 1999 Jun 7; 408(3):399-418.

Evans J, Katz ML, Levesque D, et al: A variant form of neuronal ceroid lipofuscinosis in American bulldogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2005 Jan-Feb; 19:44-51.

Flace P, Lorusso L, Laiso G, et al: Calbindin-D28K immunoreactivity in the human cerebellar cortex. *Anatomical Record*. 2014 Jul;297(7):1306-15

Flegel T, Matiasek K, Henke D, et al: Cerebellar cortical degeneration with selective granule cell loss in Bavarian mountain dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 2007 Aug; 48(8):462-5.

Forman OP, De Risio L, Stewart J, et al: Genome-wide mRNA sequencing of a single canine cerebellar cortical degeneration case leads to the identification of a disease associated SPTBN2 mutation. *BMC Genetics*, 2012 Jul 10; 13:55.

Fortin M, Marchand R, Parent A: Calcium-binding proteins in primate cerebellum. *Neuroscience Research*. 1998 Feb;30(2):155-68

Gao Y, Perkins EM, Clarkson YL, et al: β -III spectrin is critical for development of purkinje cell dendritic tree and spine morphogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 2011 Nov 16; 31(46):16581-90

Gilliam D, Kolicheski A, Johnson GS, et al: Golden Retriever dogs with neuronal ceroid lipofuscinosis have a two-base-pair deletion and frameshift in CLN5. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2015 Jun-Jul; 115(2-3):101-9.

Hahn K, Rohdin C, Jagannathan V, et al: TECPR2 Associated Neuroaxonal Dystrophy in Spanish Water Dogs. *PLoS ONE*, 2015 Nov 10;10(11):e0141824.

Hayashi Y, Homma K, Ichijo H. SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Advances in Biological Regulation*, 2016 Jan;60:95-104.

Hirai H, Matsuda S: Interaction of the C-terminal domain of delta glutamate receptor with spectrin in the dendritic spines of cultured Purkinje cells. *Neuroscience Research*, 1999 Sep;34(4):281-7.

Holder AL, Price JA, Adams JP, et al: A retrospective study of the prevalence of the canine degenerative myelopathy associated superoxide dismutase 1 mutation (SOD1:c.118G > A) in a referral population of German Shepherd dogs from the UK. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2014 Sep 25;1:10.

Holder AL, Price JA, Adams JP, et al: A retrospective study of the prevalence of the canine degenerative myelopathy associated superoxide dismutase 1 mutation (SOD1:c.118G>A) in a referral population of German Shepherd dogs from the UK. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2014 Sep 25;1:10.

Huska J, Gaitero L, Snyman H.N, et al: Cerebellar granulo-prival degeneration in an Australian kelpie and a Labrador retriever dog. *Canadian Veterinary Journal*, 54: 55-60, 2013

Johnston PE, Barrie JA, McCulloch MC, et al: Central nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Veterinary Record*, 2000 May 27; 146(22):629-33.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, et al: *Principles of Neuronal Science*. Mc Graw-Hill Companie, V ed., 2013

Kathmann I, Cizinauskas S, Doherr MG, et al: Daily controlled physiotherapy increases survival time in dogs with suspected degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2006 Jul-Aug; 20(4):927-32.

Kathmann I, Cizinauskas S, Doherr MG, et al: Daily controlled physiotherapy increases survival time in dogs with suspected degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2006 Jul-Aug; 20(4):927-32.

Katz ML, Farias FH, Sanders DN, et al: A missense mutation in canine CLN6 in an Australian shepherd with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011; 198042.

Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S: Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*, 2016 Feb 15;577(2):109-18

Kleine JF, Guan Y, Buttner U: Saccade-related neurons in the primate fastigial nucleus: what do they encode? *Journal of Neurophysiology*, 2003 Nov; 90:3137-3154.

Kurihara H, Hashimoto K, Kano M, et al: Impaired parallel fiber-Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor delta2 subunit. *Journal of the Neurological Sciences*, 1997 Dec 15; 17(24):9613-23.

Laure-Kamionowska M, Maślińska D: Calbindin positive Purkinje cells in the pathology of human cerebellum occurring at the time of its development. *Folia Neuropathology*, 2009; 47 (4): 300-305.

Laure-Kamionowska M, Taraszewska A, Maślińska D et al: Faulty position of cerebellar cortical neurons as a sequel of disturbed neuronal migration. *Folia Neuropathology*, 2006; 44(4):327-32.

Lewerenz J, Maher P: Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Frontiers in neuroscience*; 2015 dic; 16;9:469.

Lorenz MD, Coates JR, Kent M: *Handbook of veterinary neurology*; Elsevier, V ed; 2011

Mandara MT, Cantile C, Baroni M, et al: *Neuropatologia e neuroimaging*; Poletto, I ed., 2010

Minatel L, Underwood SC, Carfagnini JC: Ceroid-lipofuscinosis in a Cocker Spaniel dog. *Veterinary Pathology*, 2000 Sep; 37:488-490.

Mizukami K, Chang HS, Yabuki A, et al: Novel rapid genotyping assays for neuronal ceroid lipofuscinosis in Border Collie dogs and high frequency of the mutant allele in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2011 Nov; 23(6):1131-9.

Mizukami K, Kawamichi T, Koie H, et al: Neuronal ceroid lipofuscinosis in Border Collie dogs in Japan: clinical and molecular epidemiological study (2000-2011). *Scientific World Journal*, 2012; 383174.

Morgan BR, Coates JR, Johnson GC, et al: Characterization of intercostal muscle pathology in canine degenerative myelopathy: a disease model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 2013 Dec; 91(12):1639-50

Morgan BR, Coates JR, Johnson GC, et al: Characterization of thoracic motor and sensory neurons and spinal nerve roots in canine degenerative myelopathy, a potential disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 2014 Apr;92(4):531-41.

Netzahualcoyotzi C, Tapia R: Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity in vivo and protection by energy substrates. *Acta Neuropathologica Communications*, 2015; 3:27

Nibe K, Kita C, Morozumi M, et al: Clinicopathological features of canine neuroaxonal dystrophy and cerebellar cortical abiotrophy in Papillon and Papillon-related dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2007 Oct;69(10):1047-52.

Nibe K, Nakayama H, Uchida K. Comparative study of cerebellar degeneration in canine neuroaxonal dystrophy, cerebellar cortical abiotrophy, and neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010; 72(11):1495-1499.

Nibe K, Nakayama H, Uchida K: Immunohistochemical features of dystrophic axons in Papillon dogs with neuroaxonal dystrophy. *Veterinary Pathology*, 2009 May; 46:474-483.

Ogawa M, Uchida K, Park ES, et al: Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2011 Oct; 73(10):1275-9.

Ogawa M, Uchida K, Park ES, et al: Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2011 Oct; 73(10): 1275-9.

Park BR, Choi MA, Hong SM: Temporal changes of calbindin expression in the nodulus following unilateral labyrinthectomy in rats. *Neuroscience Letters*, 2013; 555:47-50,

Perkins EM, Clarkson YL, Sabatier N, et al: Loss of beta-III spectrin leads to Purkinje cell dysfunction recapitulating the behavior and neuropathology of spinocerebellar ataxia type 5 in humans. *The Journal of Neuroscience*, 2010 Apr 7;30(14):4857-67.

Platt SR, Olby NJ: *Manual of Canine and Feline Neurology*, III ed 2004

Pugliese M, Gangitano C, Ceccariglia S, et al: Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. *Brain Research*, 1139: 85-94, 2007

Quire LR, Berg D, Bloom FE, et al: *Fundamental Neuroscience*, 2008

Rossmeis JH Jr, Duncan R, Fox J, et al: Neuronal ceroid-lipofuscinosis in a Labrador Retriever. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003 Sep; 15:457-460.

Sarna JR, Hawkes R. Patterned Purkinje cell loss in the ataxic sticky mouse. *European Journal of Neuroscience*, 2011 Jul; 34(1):79-86.

Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S: 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum*, 2002 Dec;1(4):241-58.

Sekijima Y, Ohara S, Nakagawa S, et al.: Hereditary motor and sensory neuropathy associated with cerebellar atrophy (HMSNCA): clinical and neuropathological features of a Japanese family. *Journal of the Neurological Sciences*, 1998 Jun 11;158(1):30-7.

Squire LR., D. Berg, FE. Bloom, et al: *Fundamental Neuroscience*; Elsevier, III ed., 2008

Stepien T, Wierzba-Bobrowicz T, Lewandowska E, et al: Morphological and quantitative analysis of cerebellar cortical cells in alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 50(3):250-260, 2012

Tatalick LM, Marks SL, Baszler TV: Cerebellar abiotrophy characterized by granular cell loss in a Brittany. *Veterinary Pathology*, 1993 Jul; 30(4):385-8.

Urkasemsin G, Linder K. E, Bell J.S, et al: Mapping of Purkinje neuron loss and polyglucosan body accumulation in hereditary cerebellar degeneration in Scottish terrier. *Veterinary Pathology*, 49(5): 852-859, 2012

Urkasemsin G, Linder K. E, Bell J.S., et al: Hereditary cerebellar degeneration in Scottish terrier. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 24:565-570, 2010

Wallace K, Veerisetty S, Paul I, et al: Prenatal infection decreases calbindin, decreases Purkinje cell volume and density and produces long-term motor deficits in Sprague-Dawley rats. *Developmental Neuroscience*, 2010;32(4):302-12.

Whitney ER, Kemper TL, Rosene DL, et al: Calbindin-D28k is a more reliable marker of human Purkinje cells than standard Nissl stains: a stereological experiment. *Journal of Neuroscience Methods*, 2008 Feb 15;168(1):42-7

Whitney ER, Kemper TL, Rosene DL, et al: Density of cerebellar basket and stellate cells in autism: evidence for a late developmental loss of Purkinje cells. *Journal of Neuroscience Research*, 2009 Aug 1; 87(10):2245-54.

Wierzba-Bobrowicz T, Lewandowska E, Stępień T, et al: Differential expression of calbindin D28k, calretinin and parvalbumin in the cerebellum of pups of ethanol-treated female rats. *Folia Neuropathology*, 2011; 49 (1): 47-55.

Zeng R, Coates JR, Johnson GC, et al: Breed Distribution of SOD1 Alleles Previously Associated with Canine Degenerative Myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2014; 28:515–521.