

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Biologia Animale

Dottorato di Ricerca in
Riproduzione, Produzione e Benessere Animale
XXI Ciclo

*DINAMICA E LOCALIZZAZIONE DELL'ACCUMULO
DI PROTEINA PRIONICA PATOLOGICA (PrP^{Sc})
NELLE PLACENTE DI OVINI DI RAZZA SARDA
ARQ/ARQ AFFETTI DA SCRAPIE NATURALE E
SPERIMENTALE*

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Salvatore Naitana

Docente guida:
Chiar.mo Prof. Salvatore Naitana

Correlatore:
Dr. Ciriaco Ligios

Tesi di Dottorato di:
Dr.ssa Laura Madau

ANNO ACCADEMICO 2007 - 2008

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
Cenni generali sulle encefalopatie spongiformi	pag. 1
Il prione	pag. 6
Aspetti immuno-isto-patologici delle TSE	pag. 11
Diagnosi delle TSE	pag. 12
I ceppi dell' agente eziologico delle TSE	pag. 16
La scrapie	pag. 17
Cenni generali	pag. 17
Eziologia e basi genetiche della scrapie	pag. 18
La genetica della razza sarda	pag. 21
Patogenesi della scrapie	pag. 23
La placenta dei ruminanti	pag. 30
SCOPO DEL LAVORO	pag. 35
MATERIALE E METODI	pag. 36
Campionamento	pag. 36
Analisi per la ricerca di PrP ^{Sc}	pag. 38
Analisi genetiche	pag. 42
RISULTATI	pag. 49
DISCUSSIONE	pag. 54
CONCLUSIONI	pag. 64
BIBLIOGRAFIA	pag. 66
TABELLE	pag. 83
IMMAGINI	pag. 87

INTRUDUZIONE

Cenni generali sulle encefalopatie spongiformi trasmissibili

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSEs) rappresentano un gruppo di malattie neurodegenerative ad eziologia non ancora completamente chiarita, caratterizzate da un lungo periodo d'incubazione ed un decorso inevitabilmente fatale (Fraser 1976; Wells e McGill, 1992). Il quadro istologico è dato da spongiosi del neuropilo e vacuolizzazione neuronale (lesioni di tipo spongiforme) nel tessuto nervoso centrale (SNC), mentre quello clinico, poco specifico al suo esordio, è caratterizzato da una serie di disturbi comportamentali e neurologici che progrediscono inesorabilmente fino al decesso. Altra fondamentale caratteristica delle TSEs è l'accumulo principalmente, ma non esclusivamente, nel sistema nervoso centrale dell'isoforma patologica (PrP^{Sc}) di una normale sialoglicoproteina di membrana nota come proteina prionica PrP^C. Secondo le più accreditate teorie la PrP^{Sc} rappresenta lo stesso agente eziologico delle TSE ma, a parte questo, è sicuramente il marker diagnostico specifico (McKinley et al., 1983; Race et al., 2001).

Le TSEs, hanno un ampio spettro d'ospite, che coinvolge sia l'uomo che varie specie di mammiferi domestici e selvatici. Le TSEs umane conosciute sono rappresentate dalla malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), che può manifestarsi in forma sporadica, genetica, o talvolta iatrogena, l'insonnia fatale familiare (FFD) e la sindrome di GerstmannStraussler-Scheinker (GSS), anch'esse su base genetica, ed infine il kuru, causato da pratiche di cannibalismo.

In medicina veterinaria invece le forme maggiormente note sono rappresentate dalla scrapie della pecora, capra e muflone, dall'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) dei bovini, quest'ultima responsabile della nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD) nell'uomo (Collinge et al., 1996; Bruce et. al., 1997; Hill et al., 1997), dall'encefalopatia spongiforme felina (FSE) (Pearson, 1992) del gatto e felini selvatici, dalla chronic wasting disease (malattia da deperimento cronico) dei cervi (Miller et al., 2002), e dall'encefalopatia trasmissibile del visone (TME) (tabella 1).

PATOLOGIA	SPECIE	EZIOLOGIA
Scrapie	Piccoli ruminanti	Acquisita (ingestione). Trasmissione orizzontale. Trasmissione verticale poco chiara.
Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE)	Bovino	Ingestione alimenti contaminati
Encefalopatia Spongiforme Bovina Amiloidotica (BASE)	Bovino	Fonte sconosciuta
Chronic wasting disease	Cervidi	Acquisita (ingestione). Trasmissione orizzontale. Trasmissione verticale poco chiara.
Encefalopatia Spongiforme Felina (FSE)	Felini	Ingestione alimenti contaminati dall'agente della BSE
Encefalopatia spongiforme del visone	Visone	Acquisita (ingestione). Fonte sconosciuta.
Encefalopatia spongiforme degli ungulati esotici	Kudu, Orice	Nyala, Ingestione alimenti contaminati dall'agente BSE
Kuru	Uomo	Ingestione di alimenti contaminati.
Sindrome di GerstmannStraussler Scheinker (GSS)	Uomo	Mutazione del gene <i>PRNP</i>
Insomnia fatale familiare	Uomo	Mutazione del gene <i>PRNP</i>
Insomnia sporadica fatale	Uomo	Fonte sconosciuta
Nuova variante malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD)	Uomo	Ingestione alimenti contaminati dall'agente BSE. Trasfusione con sangue infetto
Malattia di Creutzfeldt sporadica	Uomo	Sconosciuta. Mutazione somatica o conversione spontanea di PrP ^C in PrP ^{Sc}
Malattia di Creutzfeldt familiare	Uomo	Mutazione del gene <i>PRNP</i>
Malattia di Creutzfeldt iatrogena	Uomo	Esposizione accidentale a materiale infetto

Tab. 1: principali encefalopatie spongiformi dell'uomo e degli animali (Di Guardo 2002) modificato.

Le prime documentazioni sulle TSEs umane risalgono agli anni venti, quando Creutzfeld (1920) e Jacob (1921) descrissero, indipendentemente l'uno dall'altro, 4 casi umani di una forma di rara, progressiva e fatale encefalopatia, a decorso

subacuto, caratterizzata istologicamente da degenerazione spongiforme, astrocitosi e astrogliosi. Qualche anno dopo, Gerstmann (1928) descrisse a sua volta una forma di encefalopatia degenerativa familiare a decorso cronico, caratterizzata da una lieve degenerazione spongiforme e deposizione di una sostanza amiloide. Nonostante fin dalla fine del XIX secolo fosse stata individuata in Gran Bretagna una encefalopatia endemica degenerativa nella pecora, denominata scrapie, caratterizzata da alterazioni isto-patologiche simili a quelle descritte da Creutzfeld (1920) e Jacob (1921), e da trasmissibilità (Cuillè e Chelle, 1936), l'ipotesi che la CJD fosse nosologicamente affine alla scrapie, e quindi trasmissibile, cominciò a prendere piede solo a partire dagli anni '60 con la scoperta del kuru, neuropatia degenerativa ad esito fatale identificata in una popolazione della Papua Nuova Guinea (popolazione Fore) che praticava il cannibalismo rituale. Durante il rito funebre donne e bambini, cui era affidato il compito di preparare il cadavere, si cibavano dell'encefalo. Per questo proprio i bambini e le donne erano i soggetti maggiormente colpiti dal kuru (Gajdusek e Zigas, 1957). Fu Hadlow, veterinario americano da tempo impegnato nello studio della scrapie, che nel 1959 mise in evidenza la rassomiglianza isto-patologiche tra la scrapie ed il kuru (Hadlow, 1959). Venne così abbandonata l'idea che si trattasse di una malattia genetica, e si avviarono una serie di esperimenti per trasmettere il kuru ad animali. Nel 1966 la malattia fu trasmessa con successo allo scimpanzè (Gajdusek et al., 1966). Negli stessi anni fu dimostrata anche la trasmissibilità allo scimpanzè della CJD (Gajdusek et al., 1968).

Con la dimostrazione della natura trasmissibile del kuru e della CJD, l'identificazione dell'agente causale delle TSEs diventò un importante obiettivo di ricerca.

Fu Prusiner (1982) a formulare la rivoluzionaria teoria che l'agente della scrapie, e per estensione di tutte le TSEs, fosse una molecola proteica priva di acido nucleico da lui definita *prion*. Tale proteina non era altro che la componente principale della PrP^{Sc}.

Storicamente le TSE animali non venivano considerate un rischio per la salute umana. Tuttavia l'identificazione nel Regno Unito a partire dal 1996 della vCJD nell'uomo (Will et al, 1996) e la dimostrazione che il ceppo dell'agente eziologico isolato è simile se non indistinguibile da quello che causa la BSE nel bovino (Bruce et al, 1997; Hill et al 1997), hanno di fatto portato a considerare queste malattie come potenziali zoonosi, scrapie inclusa.

Sebbene la PrP^C abbia elevati livelli di espressione nei neuroni, nelle cellule del sistema immunitario ed in minor misura in numerosi altri tipi cellulari, la sua funzione biologica rimane per molti versi oscura (Aguzzi e Polymenidou, 2004). Alcuni lavori su modelli murini knock out, ossia privati del gene che codifica per la PrP^C, hanno dimostrato che l'espressione di tale proteina è necessaria ai fini dello sviluppo della malattia (Bueler et al., 1993).

Recenti studi hanno documentato un'attività antiossidante ed un importante ruolo biologico esplicato da tale proteina nel metabolismo del rame (Aguzzi e Polymenidou, 2004), la cui omeostasi sarebbe da essa ripristinata in presenza di elevate concentrazioni di "radicali liberi dell'ossigeno" (Sakudo et al., 2004). Inoltre la localizzazione della PrP nei sinaptosomi e la sua intima associazione con il rame in ambito pre-sinaptico suggeriscono che essa possa svolgere un importante ruolo nella normale trasmissione nervosa, intervenendo pure nel metabolismo dell'ossido nitrico (NO) (Sorenson, 2001). L'NO è una piccola molecola sintetizzata ad opera

dell'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) ampiamente distribuita nel tessuto nervoso

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 5

e capace di interagire con l'ossigeno, i superossidi ed alcuni metalli di transizione, risultando implicata in numerose funzioni del SNC, ivi compresa la neurogenesi (Tessitore, 1998).

Altra importante caratteristica comune a questo gruppo di patologie è l'assenza di risposta immunitaria o infiammatoria dell'ospite. Ciò preclude la possibilità di utilizzare tecniche sierologiche per la diagnosi di malattia, che è vincolata invece alla dimostrazione della presenza di PrP^{Sc} come marker d'infezione nel sistema nervoso centrale. Inoltre il confinamento della PrP^{Sc} prevalentemente a livello di distretti anatomici difficilmente aggredibili, come il sistema nervoso centrale, ha reso fino ad oggi impossibile lo sviluppo di metodologie diagnostiche applicabili *in vivo*.

Il prione

La teoria più accreditata (Prusiner, 1982) sostiene che l'agente eziologico delle TSEs sia rappresentato da una proteina, definita PrP^{Sc} o PrP^{Res} derivante dalla conversione aberrante di una normale proteina cellulare di membrana (PrP^C) codificata dall'ospite.

A tale conclusione si è giunti dopo innumerevoli dissertazioni sulle caratteristiche di tale sconosciuto agente eziologico, che ha sconvolto uno dei caposaldi della biologia, ossia la capacità di riprodursi in assenza di acidi nucleici. I maggiori progressi nello studio dell'agente causale delle TSEs risalgono agli anni Sessanta, allorché si scoprì che tale agente veniva inattivato da sostanze che distruggono le proteine (proteasi, detergenti, acidi forti). Prusiner, riprendendo l'ipotesi proposta dal matematico Griffith (1967), secondo la quale l'agente di queste malattie poteva essere rappresentato da una proteina infettiva, introdusse il concetto di "prione" cioè,

di un agente infettante privo di acidi nucleici, distinto dai virus per la mancanza di

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 6

una struttura propria e parzialmente resistente alla digestione con un enzima proteolitico come la proteinasi K.

La PrP^C, che è codificata dal gene *PRNP* (Oesch et al., 1985; Basler et al., 1986), nella sua forma matura è costituita da circa 253 aminoacidi e si trova per lo più localizzata sulle membrane citoplasmatiche, con un ancoraggio di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) in corrispondenza della sua estremità C-terminale.

Parte della proteina, però, dopo essere arrivata in superficie, torna ciclicamente all'interno della cellula ove subisce un taglio ed un processo di maturazione in corrispondenza dei terminali carbossilico ed amminico, per essere poi ricondotta in superficie, e prevalentemente localizzata a livello di ancoraggio del GPI in un microdominio resistente ai detergenti (Vey et al., 1996).

Tale processo comporta a sua volta la formazione di una proteina di 209 aminoacidi. Da questo momento in poi la PrP può essere liberata in seguito al taglio dell'ancoraggio al GPI, oppure internalizzata per endocitosi ciclica tra il compartimento endocitico e la superficie cellulare (Shyng et al., 1993).

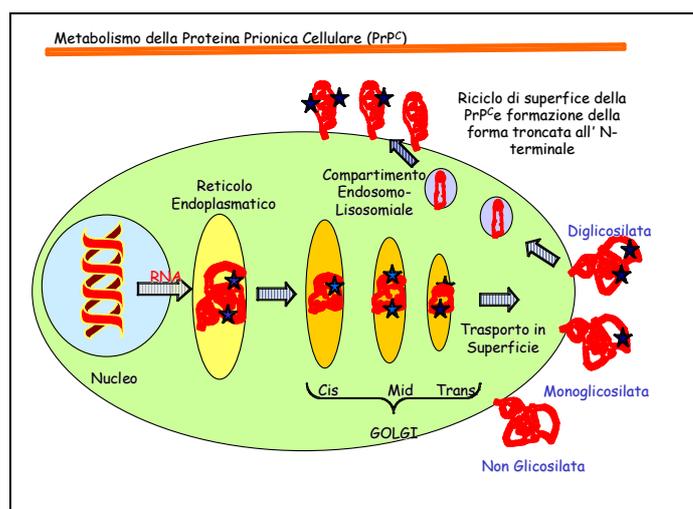


Fig. 1: metabolismo della proteina prionica cellulare PrP^C, da Zanusso (2007).

La conversione della PrP^C nella forma PrP^{Sc}, consiste nel passaggio della proteina da una struttura secondaria e terziaria costituita prevalentemente da una conformazione ad α -eliche (figura 2a) ad una forma in cui prevale l'organizzazione a β -foglietti (Figura 2b) (Horiuchi, 1999; Baldwin, 1995; Wille et al., 2002).

Questi cambiamenti conformazionali conferiscono alla PrP^{Sc} delle caratteristiche nuove: essa diviene resistente al trattamento con proteinasi K ed insolubile in detergenti deboli (Sparkes et al., 1986).

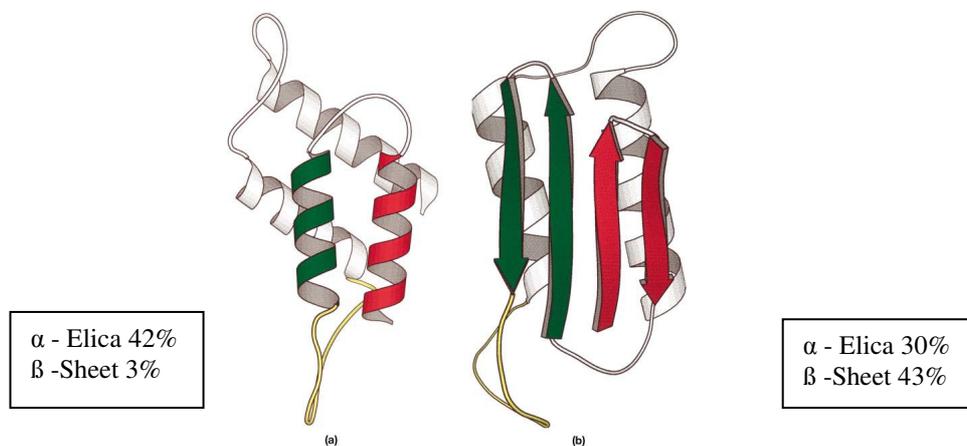


Fig.2: rappresentazione della struttura terziaria della proteina prionica cellulare (a) PrP^C, con 4 α -eliche, e dell'isforma patologica (b), con 2 α -eliche e 4 β -foglietti.

Il prione possiede, inoltre, alcune peculiari caratteristiche di infettività: esso può infatti propagare questa proprietà alla PrP^C in maniera “autocatalitica”, cosicché i tessuti che la albergano sono a loro volta in grado di trasmettere l'infezione ad altri ospiti “recettivi” (Aguzzi e Polymenidu, 2004).

La PrP^{Sc} ha un peso molecolare di 33-35 kDa e, se sottoposta all'azione della proteinasi K, viene parzialmente degradata perdendo 67 aminoacidi ed assumendo in tal modo un peso molecolare pari a 27-30 kDa. Proprio quest'ultima molecola polimerizzando, dà luogo alle cosiddette fibrille simil-amiloidee, (Scrapie-

Associated Fibrils o SAF). Tali fibrille, di 20 nm di diametro, 100-200 nm di lunghezza e composte da 2- 3 protofilamenti dritti o talvolta attorcigliati, di 4-6 nm di diametro, si organizzano in depositi presenti a livello cerebrale in tutte le TSEs (Prusiner, 1991).

Per spiegare il meccanismo che sta alla base dell'accumulo della PrP^{Sc} all'interno della teoria prionica sono stati proposti due modelli (Aguzzi e Polymenidou, 2004). Secondo il primo modello, detto "template direct refolding", l'interazione fra la PrP^{Sc} "infettiva" esogena e la PrP^C endogena determinerebbe la conversione di quest'ultima nell'isoforma patologica (Fig.3).

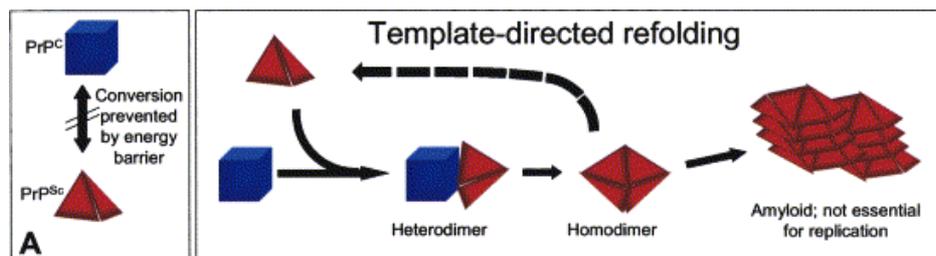


Fig.3: Modello di conversione della PrP^C in PrP^{Sc} "template-direct refolding". (Aguzzi e Polymenidou, 2004).

In condizioni di normalità un'elevata barriera energetica impedirebbe la conversione spontanea della PrP^C in PrP^{Sc}.

Nel secondo modello, denominato "seeded nucleation", la PrP^C e la PrP^{Sc} coesistono in un equilibrio termodinamico reversibile. Il reclutamento e l'aggregazione in fibrille amiloidi di forme monomeriche di PrP^{Sc} esita nella formazione di strutture altamente ordinate simil-cristalline, in cui la PrP^{Sc} diviene stabile; la successiva frammentazione di tali aggregati aumenta il numero di nuclei di cristallizzazione, i quali possono reclutare altra PrP^{Sc} e portare ad un'apparente replicazione dell'agente prionico (Fig.4).

La normale funzione della PrP è ancora scarsamente conosciuta; alcuni studi hanno implicato il suo ruolo nella trasmissione dell'impulso nervoso, nel legame del rame, nell'omeostasi dello stress ossidativo, nel mantenimento del ritmo circadiano e nella traduzione del segnale cellulare.

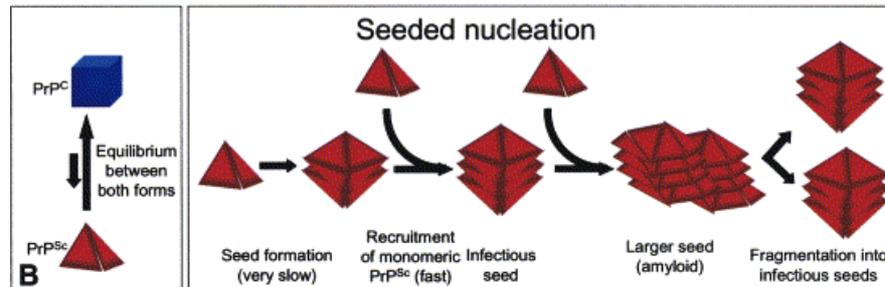


Fig.4: Modello di conversione della PrP^C in PrP^{Sc} “Seeded nucleation”. (Aguzzi e Polymenidou 2004).

Pr quanto riguarda il metabolismo del rame, la PrP^C, essendo una sialoglicoproteina di membrana, potrebbe captare ioni rame presenti in sede extracellulare ed agire da carrier dall'esterno all'interno della cellula.

Inoltre la PrP^C potrebbe agire captando gli ioni rame in sede extracellulare e trasportandoli all'interno della cellula mediante il proprio dominio trans-membrana per poi “presentarli”, attraverso il proprio dominio intracellulare, ad apposite proteine citoplasmatiche, proteggendo così i neuroni dalla tossicità del rame libero (Brown et al., 1997).

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

Polymenidou, 2004; Aguzzi e Heikenwalder, 2006).

Sembra inoltre che la PrP^C sia coinvolta nella regolazione dell'omeostasi ossidativa cellulare, e ciò contribuirebbe a spiegare l'alterata risposta e l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo da parte dei neuroni in corso di TSEs (Vassallo e Hermes, 2003).

Aspetti neuro-patologici delle TSE

La principale alterazione a livello del sistema nervoso centrale, comune a tutte le TSEs, è rappresentata da spongiosi della sostanza grigia cerebrale nella quale si formano dei vacuoli nei neuroni, sia nei processi dendritici e assonali (vacuolizzazione del neuropilo) che nel corpo cellulare (vacuolizzazione neuronale). Altri aspetti lesivi, più o meno accentuati a seconda della TSE, sono la perdita neuronale, l'ipertrofia e iperplasia astrocitaria (astrocitosi/astrogliosi) (Fraser, 1976; Wells et al, 1995; Wood et al, 1997).

In merito alla morfo-patogenesi delle lesioni in corso di TSE, non è ad oggi ancora chiaro come il cambiamento conformazionale della PrP^C in PrP^{Sc} possa determinare la morte cellulare, né se il danno neuronale sia dovuto alla perdita della normale funzione della PrP^C, alla tossicità della PrP^{Sc} o a entrambi i fattori (Kovacs e Budka, 2008). Per quanto riguarda l'azione della PrP^{Sc} nel processo patogenetico, sembra che ci sia una correlazione anatomica e temporale fra l'accumulo della proteina patologica e la comparsa delle lesioni neurologiche, indice quindi della tossicità della PrP^{Sc} (Unterberger et al., 2005), anche se tale correlazione non è ancora del tutto definita. Un ruolo decisivo sembra essere svolto dalla localizzazione della PrP^{Sc}. Infatti l'effetto neurotossico e la degenerazione si osservano quando la proteina si accumula a livello citoplasmatico (Tatzelt et al., 2007). La PrP^{Sc}, penetrata nei

neuroni e/o astrociti, si localizzerebbe nelle membrane delle cisterne dell'apparato di Golgi, interposte fra la sede di sintesi e le vie di escrezione delle proteine. In tale sede si verificherebbe l'interazione fra la PrP^c e la PrP^{Sc} e la conseguente neoformazione di PrP^{Sc} che si accumulerebbe in quantità progressivamente crescenti all'interno della cellula (Brandner, 2003). Vacuolizzazione e rigonfiamento dei neuroni sarebbero dovuti proprio alla "replicazione" della PrP^{Sc}. Il meccanismo biochimico della degenerazione vacuolare è stato identificato in un'attivazione diretta o indiretta del canale recettoriale per l' N-metil-D-aspartato (NMDA), che è un canale ionico per il calcio. Il conseguente aumento della concentrazione di ioni Ca²⁺ nei neuroni, a causa dell'incremento dell'osmolarità cellulare che ne deriva, provocherebbe il rigonfiamento idropico-vacuolare alla base della spongiosi (Di Guardo 2002). Sempre l'aumentata presenza intracellulare di ioni Ca²⁺ sarebbe la base patogenetica dell'apoptosi, fenomeno attraverso il quale avverrebbe il danno regressivo e la scomparsa dei neuroni (Giese e Kretschmar, 2001).

Diagnosi delle TSE

Diagnosi istologica ed immunoistochimica. I principi su cui si basa la diagnosi delle TSE sono analoghi sia in campo animale che umano. Ad oggi non è ancora possibile effettuare diagnosi di TSE *intra vitam* in modo certo e inconfutabile. Perciò da un punto di vista clinico è possibile avanzare solo un sospetto. L'età, il decorso clinico protratto ed infausto, l'assenza di una risposta infiammatoria e/o immunitaria ed il quadro clinico neurologico sono elementi sufficienti per emettere un sospetto. La sintomatologia, in corso di TSE, può essere confusa con altre patologie, soprattutto a carico del SNC, a carattere infettivo, metabolico e degenerativo.

La ricerca della PrP^{Sc} rappresenta il momento chiave del processo diagnostico.

Nei test diagnostici per le TSEs viene sfruttata la resistenza della forma patologica di PrP alla proteinasi K. Il trattamento con proteinasi K, infatti, ed il successivo utilizzo di anticorpi anti PrP permettono di rilevare esclusivamente la forma patologica della proteina, l'unica a resistere alla degradazione enzimatica.

La localizzazione encefalica delle lesioni spongiformi e dei depositi di PrP^{Sc} nelle diverse TSEs presenta caratteristiche differenti. Nella scrapie classica e nella BSE la presenza di PrP^{Sc} è localizzata principalmente nel midollo allungato ed in particolare l'obex. Tale regione anatomica rappresenta perciò il sito di campionamento ufficiale per la diagnosi di tali TSEs, anche perché è il primo sito encefalico ad essere interessato. La vCJD mostra spongiosi diffusa, con degenerazione del tessuto neuronale e astrogliosi molto prominente nei nuclei basali e nel talamo, con placche di amiloide, distribuite in tutto l'encefalo. Le placche hanno tipicamente un core denso circondato da spongiosi con pattern istolesivo di tipo daisy-like floral (Chesebro, 2003).

La scrapie atipica da Nor98 si differenzia invece dalla scrapie classica e dalla BSE per distribuzione neuroanatomica delle lesioni istopatologiche e della PrP^{Sc} nel cervello. L'istologia del tessuto cerebrale rivela vacuolizzazione essenzialmente nel cervelletto e nella corteccia cerebrale, mentre risulta meno diffusa a livello dell'obex sino a mancare del tutto. La localizzazione delle lesioni e della PrP^{Sc} appare differente anche nella BASE rispetto alla BSE classica. Infatti nella BASE si riscontra solo una debole positività a livello del tronco encefalico, con assenza di coinvolgimento del nucleo del vago (NMDV). Le placche amiloidi tipiche della BASE si osservano invece nel talamo, sostanza bianca subcorticale, e strati profondi della corteccia cerebrale e nel bulbo olfattivo (Casalone et al., 2005).

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

Attualmente l'iter diagnostico prevede, a conferma del sospetto clinico, l'esame istologico del SNC per l'evidenziazione delle tipiche lesioni e la ricerca, sempre a livello cerebrale, della PrP^{Sc} che può essere rilevata attraverso tecniche immunoistochimiche.

Oltre a rilevare la presenza di PrP^{Sc} nel cervello, consente anche di valutarne la localizzazione e la distribuzione extraneuronale. In particolare, in campo animale l'evidenziazione della PrP^{Sc} nel tessuto linfatico (SLR) di pecore infette da scrapie ha aperto promettenti prospettive per lo sviluppo di metodologie di diagnosi precliche *in vivo*. E' stato infatti dimostrato recentemente che la PrP^{Sc} può essere rilevata a livello dei tessuti linfatici con grande anticipo rispetto alla sua deposizione cerebrale ed alla comparsa dei sintomi clinici (Schreuder et al., 1998). Purtroppo, la presenza di PrP^{Sc} a livello del sistema linforeticolare non è una costante di tutte le TSE.

La deposizione/distribuzione della PrP^{Sc} rappresenta un evento importante non solo a fini diagnostici, ma anche ai fini della individuazione del ceppo di TSE in causa.

Per quanto riguarda la scrapie, di cui sono stati identificati circa 20 ceppi differenti, la distribuzione della PrP^{Sc} nell'encefalo nel caso di casi atipici, come il Nor 98 (Benestad, 2003), appare profondamente diversa dalla scrapie classica, con la deposizione di PrP^{Sc} soprattutto a livello della corteccia cerebellare e cerebrale piuttosto che a carico del midollo allungato, in cui si ha la maggior deposizione in caso di scrapie classica. La caratteristica distribuzione immunoistochimica ha consentito inoltre di differenziare il fenotipo classico della BSE, dalla forma amiloidea della BASE (Casalone et al, 2004), che ha invece mostrato caratteristiche di deposizione simili a quanto osservato nella CJD sporadica.

Ancora, il pattern di deposizione immunoistochimica ha fornito indicazioni importanti sulla differenziazione tra la BSE e la scrapie, in cui differenze

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 14

morfologiche significative sono state riscontrate a livello dei granuli della PrP^{Sc} nei macrofagi tingibile body (TBMs). In pecore infettate con la BSE la PrP^{Sc} appare sotto forma di singoli granuli, mentre veri e propri accumuli sono stati rilevati nelle tonsille di pecore con la scrapie (Thuring et al., 2005).

Tale tecnica ha consentito inoltre di evidenziare la peculiare caratteristica delle placche amiloidi in corso di GSS dell'uomo. Si tratta di placche estese ed abbondanti, localizzate principalmente nella corteccia cerebrale, dotate di un core fibrillare singolo o multicentrico. La colorazione immunohistochimica con diversi anticorpi ha rilevato porzioni differenti della placca. In particolare, con l'anticorpo monoclonale 6H4 è stata messa in evidenza solo la componente diffusa, mentre anticorpi specifici per la porzione N-terminale della proteina ne hanno evidenziato il core (Woulfe et al., 2005). Tale caratteristica dipende dallo stadio maturativo della placca, ed è stata spiegata con la presenza di frammenti della proteina di 8 – 14 kDa che si accumulano nel core della placca e non sono rilevabili con anticorpi che riconoscono epitopi C-terminali della proteina.

Lo stesso pattern immunohistochimico si osserva nelle “simil placche” rilevate nella scrapie atipica da Nor98 (Iulini et al., 2006).

Diagnosi mediante ELISA e Western Blotting. Le metodiche immunobiochimiche utilizzate nella diagnosi di TSE sono rappresentate fondamentalmente dall'ELISA e dal Western Blotting (WB).

Il sistema ELISA è una tecnica immunoenzimatica (ELISA Sandwich) che utilizza un anticorpo monoclonale per la rivelazione della PrP^{Sc} ed un anticorpo secondario coniugato con un enzima (perossidasi o fosfatasi alcalina). Dopo il trattamento con la PK la PrP^{Sc} eventualmente presente nel campione in esame si lega all'anticorpo specifico adeso ai pozzetti sensibilizzati. L'aggiunta del secondo anticorpo coniugato

e del suo substrato dà origine, nel caso di positività, ad una reazione colorimetrica rilevabile con lettura spettrofotometrica. Il WB basa la sua elevata precisione ed affidabilità sulla verifica sia della resistenza della PrP^{Sc} alla PK, sia alle sue dimensioni. La PrP^{Sc} viene degradata dalla PK in frammenti di dimensioni che variano da 32-35 kDa a 27-30 kDa, sottoposta a precipitazione, migrazione elettroforetica, trasferimento su membrana di nitrocellulosa (PVDF) ed incubazione con uno specifico anticorpo monoclonale anti-PrP. Quest'ultimo riconosce un epitopo presente nei frammenti di 27-30 kDa della proteina prionica.

Attraverso questa reazione si ottiene la rilevazione della PrP^{Sc} che appare con pattern elettroforetico dato da tre bande caratteristiche, separate in base al peso molecolare, che rappresentano i frammenti della PrP^{Sc} (banda diglicosilata, monoglicosilata, non glicosilata). Il rapporto quantitativo fra le diverse bande costituisce il presupposto su cui si basa una delle metodiche di caratterizzazione dei ceppi delle TSEs.

I ceppi dell'agente eziologico delle TSEs

Uno dei problemi principali della teoria prionica è giustificare l'esistenza di differenti ceppi di prioni, essendo questi ultimi semplici proteine.

Infatti l'esistenza di differenti ceppi di prioni è nota già dagli anni '60 (Pattison and Millson, 1961), quando trasmissioni successive nella capra di un caso di scrapie ovina portarono alla comparsa di due fenotipi clinici differenti, che si mantenevano costanti nella trasmissione da capra a capra. Ad oggi sono stati caratterizzati circa 20 ceppi di scrapie, purificati mediante passaggi seriali di materiale infetto, proveniente da ovini malati, in particolari linee genetiche di topi. Questi ceppi sono stati identificati sulla base dei patterns istolesivi di vacuolizzazione (profilo istolesivo) nel cervello e in base al tempo di incubazione medio rilevati in questi topi.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 16

I limiti di questa tecnica sono però rappresentati dalla lunga durata dell'esperimento, dell'ordine di alcuni anni, e dal fatto che alcuni ceppi non determinano la malattia nel topo.

A questo proposito sono stati messi a punto altri metodi di caratterizzazione dei ceppi (strain typing), utilizzabili direttamente sull'ospite naturale, rappresentati dal profilo istologico, dal profilo immunostochimico e dalla glicotipizzazione.

La glicotipizzazione costituisce un'analisi della PrP^{Sc} in WB che si basa sullo studio del pattern di migrazione elettroforetica della PrP^{Sc} trattata con proteinasi K. Il rapporto quantitativo della glicosilazione delle due bande mono e di-glicosilata, e la misura della banda non-glicosilata ottenuta in elettroforesi dopo trattamento con l'enzima N-glycosidase che elimina i glicani dalle catene aminoacidiche, sono i parametri che caratterizzano i ceppi e che stabilizzano la similitudine tra campioni analizzati.

LA SCRAPIE

Cenni generali.

La scrapie è una malattia conosciuta da più di 200 anni e diffusa in tutto il mondo. Solo l'Australia e la Nuova Zelanda ne sono ritenute ufficialmente indenni. La malattia è stata identificata per la prima volta nel Regno Unito nel 1732 (Mc Gowan, 1922), mentre in Italia il primo caso è stato segnalato nel 1976 nella regione Piemonte (Cravero et al., 1977). In seguito tale patologia è stata descritta sporadicamente in diverse regioni.

La malattia è caratterizzata clinicamente da un decorso cronico e da una serie di sintomi che comprendono variazioni comportamentali, tremori, atassia particolarmente accentuata agli arti posteriori, prurito e scialorrea. L'exitus si

verifica in media entro 1-5 mesi dalla comparsa dei primi sintomi.

Nella pecora la PrP^{Sc} è rilevabile sia nel SNC che nel SLR ed in numerosi altri tessuti extraneuronali. Tra questi: fibre muscolari (Andreoletti et al., 2004), placenta (Tuo et al., 2001; Andreoletti et al., 2002), lingua (Casalone et al., 2005), ghiandole salivari (Vascellari et al., 2007), mammella e rene (Ligos et al., 2005, 2007).

La prevalenza della malattia all'interno del gregge è generalmente ritenuta bassa, intorno al 2-5 % (Young et al., 1966, Palsson, 1979) ma in alcuni casi si sono registrate delle incidenze molto alte (Kativar, 1962; Sigurdarson, 1954; Parry, 1960).

Lo studio della distribuzione di frequenza dei casi clinici di scrapie per classi di età rileva una maggiore prevalenza della malattia tra i 2 ed i 5 anni (Hoinville., 1996).

Eziologia e basi genetiche della scrapie.

Sebbene la patogenesi non sia ancora del tutto chiarita nei suoi innumerevoli aspetti, si può oggi affermare che la scrapie trovi la sua origine in una complessa interazione tra un agente trasmissibile ed uno o più fattori genetici dell'ospite, correlati a diversi polimorfismi della regione di *PRNP* che codifica per la parte C-terminale della proteina (Hunter et al., 1992).

L'importanza della genetica nell'eziopatogenesi della scrapie era stata osservata da tempo. I primi esperimenti risalgono infatti agli anni settanta nel Regno Unito, dove venne effettuata una prima selezione genetica su un gruppo di ovini infettati sperimentalmente. I soggetti del gruppo che non manifestarono segni clinici di malattia furono utilizzati per costituire un successivo gruppo sperimentale di pecore resistenti. Facendo incrociare queste pecore, con altre provenienti da allevamenti infetti, si poteva rilevare una diminuzione dell'incidenza della malattia che diminuiva col procedere degli incroci della discendenza (Davies e Kimberlin, 1985).

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 18

Sebbene siano stati descritti oltre 25 differenti polimorfismi del gene *PRNP* (Goldmann et al., 2005), solo le mutazioni ai codoni 136, 154 e 171 risultano essere strettamente correlate al carattere di suscettibilità/resistenza alla scrapie (Hunter, 1997). Il gene ancestrale a questi codoni è ritenuto essere ARQ (ARQ_{wildtype}) dove A indica l'aminoacido Alanina, R l'Arginina and Q la Glutamina, codificati ai codoni 136, 154 and 171, rispettivamente (Goldmann et al., 2005). La sostituzione di A con la Valina (V) al codone 136 aumenta la suscettibilità alla scrapie (Hunter et al., 1994), la sostituzione di R con l'istidina (H) al codone 154 è associata alla resistenza (Hunter, 1997), sebbene questa ultima affermazione non sia ancora universalmente accettata (Dawson et al., 1998); la sostituzione di Q con H al codone 171 non modifica la suscettibilità alla scrapie, mentre quella di Q con R induce la resistenza (Baylis e Goldmann, 2004).

Tali sostituzioni danno origine a 5 alleli: VRQ, ARQ, AHQ, ARH, ARR, i quali si possono combinare in 15 differenti genotipi che sono correlati a un diverso grado di suscettibilità/resistenza alla scrapie.

Negli ultimi anni sono stati condotti in tutto il mondo studi relativi alla distribuzione degli alleli del gene della PrP nelle diverse razze ovine.

Razze come la Suffolk, Cotswold, Hampshire Down hanno una variabilità molto ristretta con solo 2 alleli: ARQ e ARR e quindi 3 possibili genotipi dati dalla combinazione di tali alleli (ARQ/ARQ, ARQ/ARR, ARR/ARR).

Razze come Poll Dorset, Border Leicester, Charollais, dette razze Valina, hanno una maggiore variabilità esprimendo 3 diversi alleli con l'aggiunta di VRQ.

Pecore Cheviot, Shetland, Welsh Mountain presentano invece 4 diversi alleli: ARQ, ARR, AHR, VRQ.

Le razze con la più alta variabilità genica sono risultate la Texel e la Lleyn, con 5 diversi alleli e tutti i possibili genotipi che ne derivano. La distribuzione degli alleli nelle varie razze è descritto in tabella 2.

Alleli Predominanti	Razze
ARQ, ARR	Cotswold, Hampshire, Down, Soay, Suffolk, Vendeen
ARQ, ARR, VRQ	Bleu du Maine, Border Leicester, Charollais, Poll Dorset,
ARQ, ARR, AHQ	Bleufaced Leicester, Sarda
ARQ, ARR, AHQ, VRQ	Cheviot, Dalesbred, Herdwick, Scottish Blackface, Shetland, Swaledale, Welsh Mountain
ARQ, ARR, AHQ, VRQ, ARH	Texel, Lleyn

Tab.2: distribuzione degli alleli nelle principali razze ovine.

Studi condotti sulla relazione che esiste tra il genotipo di pecore appartenenti a razze diverse e il grado di suscettibilità alla scrapie, hanno dimostrato che in razze che portano l'allele VRQ, i genotipi sensibili all'infezione sono VRQ/VRQ e VRQ/ARQ, mentre quello più resistente è il ARQ/ARQ (Dawson M. et al., 1998).

Invece in razze come la Suffolk, per esempio, dove manca l'allele VRQ, la malattia si manifesta negli animali con genotipo ARQ/ARQ e solo raramente in quelli con genotipo ARQ/ARR o VRQ/VRQ (Westaway et al., 1994).

La presenza dell'allele ARR è sempre correlata ad un ridottissimo rischio di infezione, sia nelle razze che esprimono l'allele VRQ come allele sensibile, sia in quelle che hanno quello ARQ. Il genotipo omozigote ARR/ARR, tranne alcuni rarissimi casi, non è stato riscontrato in ovini affetti da scrapie, di conseguenza rimane la forma genetica che esprime la maggiore resistenza. Inoltre nelle razze in cui la malattia è correlata all'allele ARQ, poiché l'allele ARR è dominante rispetto a questo, gli animali eterozigoti appaiono già notevolmente resistenti alla malattia. Nelle razze in cui l'allele sensibile è VRQ, codominante nei confronti di ARR, la malattia, nel genotipo VRQ/ARR è possibile, seppure con tempi di incubazione più lunghi.

Recenti studi ed informazioni derivanti dall'attività di sorveglianza indicano che la resistenza alle TSEs non è un fenomeno assoluto. Appare evidente l'esistenza di ceppi di TSEs che colpiscono prevalentemente gli ovini con genotipo ARQ/ARQ (tra cui il ceppo responsabile della BSE) e ceppi che colpiscono preferibilmente ovini recanti l'allele VRQ. Pertanto, l'attribuzione del livello di rischio a ciascun genotipo ovino non va generalizzata ma dipende in una certa misura dalle caratteristiche dei ceppi circolanti. Può considerarsi certo, comunque, che l'aumento della frequenza del genotipo ARR/ARR nelle popolazioni ovine garantisce la diminuzione della presenza dell'agente della scrapie.

Per questo l'Unione Europea, con il Regolamento CE 260/2003 del 12 Febbraio 2003 (che concerne l'eradicazione delle encefalopatie spongiformi negli ovini e nei caprini e le regole per il commercio di ovini e caprini vivi) e con la Decisione 2003/100 (che fissa i requisiti minimi per l'istituzione di programmi d'allevamento di ovini resistenti alle encefalopatie spongiformi trasmissibili), ha avviato

l'attuazione di piani di selezione genetica per la resistenza alla scrapie segnalando la

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 21

genetica come strumento per la eradicazione della scrapie dai focolai di malattia nei diversi Stati Membri dell'Unione Europea.

La genetica della razza sarda.

La razza sarda è la razza maggiormente rappresentativa e d'importanza economica più rilevante in Italia.

Le varianti alleliche del gene della PrP, riscontrate rispetto al gene ancestrale ARQ, relative ai 3 codoni che modulano la sensibilità alla scrapie, sono soltanto due: AHQ e ARR, che si possono combinare a dare sei diversi genotipi: ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, AHQ/ARR, ARR/ARR, AHQ/AHQ (Tab. 3) (Vaccari et al., 2001). La valina al codone 136 è stata rilevata in una percentuale bassissima, all'incirca dello 0,04%. Lo stesso vale per la mutazione che sostituisce l'istidina (H) alla glutamina (G) al codone 171. Come per tutte quelle razze che hanno una frequenza bassa o nulla dell'allele VRQ, anche per la Sarda il genotipo sensibile risulta essere ARQ/ARQ. La mutazione al codone 154, che vede la sostituzione di un'arginina con l'istidina (AHQ), non sembra modificare la suscettibilità dell'animale nei confronti dell'infezione, che presenta un livello di rischio simile a quello del gene non mutato. Mancando il polimorfismo al codone 136, la suscettibilità alla malattia dipende esclusivamente dai polimorfismi al codone 171, a livello del quale, la presenza della glutamina in omozigosi è essenziale.

Genotipo	Suscettibilità
ARR/ARR	minima o nulla
ARR/ARR	genotipo raro. Si suppone suscettibilità scarsa
ARR/AHQ	genotipo raro. Si suppone suscettibilità scarsa
ARQ/ARR	suscettibilità scarsa
ARQ/ARQ	suscettibilità elevata
ARQ/AHQ	suscettibilità elevata
AHQ/AHQ	genotipo raro. Si suppone suscettibilità scarsa

Tab. 3: suscettibilità genetica alla scrapie in ovini di razza sarda.

Al contrario, l'arginina al codone 171 rivela una stretta correlazione con la resistenza alla malattia. Per quanto riguarda la razza sarda, sono stati sinora rilevati ulteriori polimorfismi ai codoni: 112 in cui la Metionina è sostituita dalla Treolina (M112T); 137 (M137T); 141 con la sostituzione della Leucina con la Fenilalanina (L141F); 142 in cui la Isoleucina viene sostituita dall'Istidina (I142H), 143 con la sostituzione di Istidina con l'Arginina (H143R); 154 in cui l'Arginina è sostituita dall'Istidina (R154H); 176 dove l'Asparagina viene sostituita dalla lisina (N176K), presenti in omozigosi o in eterozigosi. Tali polimorfismi sembra possano influenzare il carattere di resistenza/suscettibilità alla scrapie all'interno del genotipo ARQ/ARQ.

Da alcuni recentissimi lavori (Vaccari et al 2007; Ligios et al, 2007) sembra che tra questi polimorfismi, quelli ai codoni 137 e 176 riducano significativamente il rischio di contrarre la malattia, mentre quelli al codone 154 e 141 pare abbiano anch'essi un effetto protettivo, anche se meno intenso dei precedenti, ed inoltre sembra che agiscano allungando i tempi d'incubazione della malattia.

Patogenesi della scrapie.

Nonostante la scrapie naturale sia nota da più di due secoli la conoscenza della sua patogenesi presenta ancora numerose lacune. Il periodo preclinica della malattia è indubbiamente una delle fasi nella patogenesi della scrapie ad oggi ancora poco conosciuta. Ciò spiegherebbe, almeno in parte, la mancanza di strumenti diagnostici precoci utilizzabili nell'animale in vita come screening di massa.

La maggior parte degli studi sulla patogenesi della scrapie si basano sul controllo istologico ed immunoistochimico di soggetti sperimentalmente infettati e poi

sacrificati sequenzialmente in periodi diversi, sull'esame di ovini di differente età provenienti da greggi naturalmente infetti o ancora su modelli murini.

Le esatte modalità attraverso cui gli animali contraggono l'infezione non sono del tutto chiare, sebbene la via orale sembra costituire la via d'ingresso principale dell'agente infettante (Monlèon et al., 2005). Vari ricercatori (Andreoletti et al., 2000; Van Keulen et al., 2000) hanno evidenziato, infatti, la presenza di PrP^{Sc} a livello delle placche del Peyer e successivamente del tessuto linfatico associato all'intestino GALT in agnelli VRQ/VRQ di 2-3 mesi e 5 mesi d'età naturalmente infetti.

Il meccanismo con cui il prione attraversa la barriera mucosale dopo l'ingestione non è ben definito. La teoria più probabile attribuisce tale compito alle cellule M, linfoepiteliali, specializzate nel captare e trasportare macromolecole e particelle attraverso la barriera intestinale fino ai tessuti sottostanti. Una seconda teoria ritiene che le cellule M non siano affatto indispensabili nel meccanismo di uptake, e che questo potrebbe avvenire in seguito all'attività degli enzimi digestivi, in grado di ridurre il prione in molecole più piccole, che attraverserebbero la mucosa legate a proteine come la ferritina. Infine una terza teoria suggerisce un uptake diretto delle cellule dendritiche mediante l'inserimento dei loro processi tra le cellule epiteliali a livello delle tight junction fino al lume. Quest'ultimo meccanismo è stato dimostrato per i batteri ma non per i prioni (fig.5).

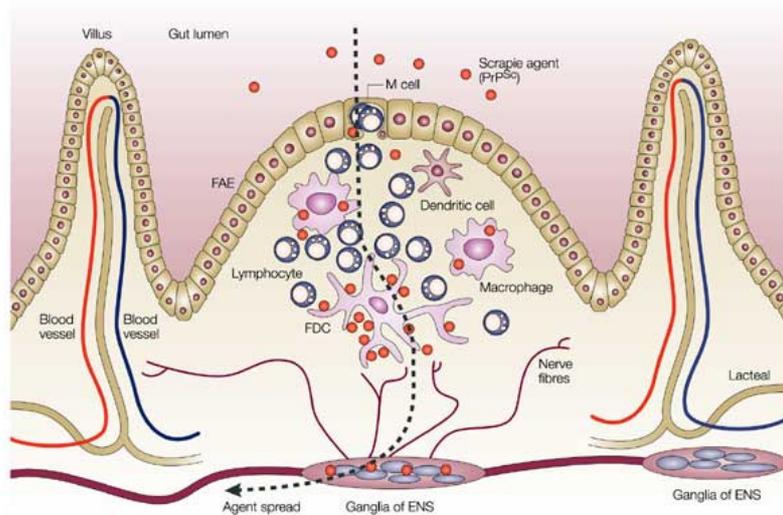


Fig 5: rappresentazione schematica dei possibili meccanismi attraverso i quali la PrP^{Sc} supera la barriera intestinale e raggiunge il tessuto nervoso dell'ENS. (Mabbott e Bruce 2006).

Dopo aver attraversato la mucosa intestinale la PrP^{Sc} si accumula nel GALT e nelle placche del Peyer .

Nei noduli linfatici delle placche del Peyer e del GALT (come successivamente nel resto del tessuto linfatico) l'accumulo di PrP^{Sc} si evidenzia nelle cellule follicolari dendritiche (FDC) mature e nei macrofagi tingibile body (MTB). Le FDC sono abbondanti nella parte periferica del centro germinativo dei noduli linfatici ed in altre sedi timo-dipendenti degli organi linfatici, come la zona marginale della polpa bianca della milza ed i cordoni midollari dei linfonodi. Si tratta di cellule di grandi dimensioni, irregolarmente stellate, con lunghi prolungamenti ramificati connessi con quelli delle cellule dendritiche vicine e con molti linfociti B. Tali cellule hanno la funzione di presentare gli antigeni ai linfociti: una volta incontrato l'antigene, le FDC lo rielaborano, lo concentrano e lo espongono sulla superficie, presentandolo ai linfociti. Svolgono quindi un ruolo immunostimolante, in quanto favoriscono il

contatto dei linfociti B del centro germinativo dei noduli linfatici con gli antigeni stessi. Anche i linfociti B sembrano avere un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia, anche se ancora non del tutto chiaro. Sembra che la loro importanza sia essenzialmente legata al fatto che permettono la maturazione e pertanto il raggiungimento della completa funzionalità delle FDC elaborando fattori quali le linfofosfine α/β di membrana (Montrasio, 2000).

Dopo la prima replicazione nel GALT la PrP^{Sc} viene evidenziata in tutti i distretti linfatici, che raggiunge probabilmente attraverso la via linfatica ed ematica.

Oltre che nel tessuto linfatico la presenza di PrP^{Sc} si osserva, in una fase estremamente precoce, anche a livello del sistema nervoso enterico intestinale (ENS) rappresentato dal plesso nervoso mioenterico di Auerbach e dal plesso sottomucoso di Meissner.

Si ritiene che l'infezione dell'ENS possa verificarsi immediatamente dopo l'uptake intestinale, per contatto con le sottili fibre nervose del plesso sottomucoso che giacciono immediatamente sotto l'epitelio del villo, oppure in seguito alla precedente contaminazione del tessuto linfatico.

Il passaggio da GALT e placche Peyer all'ENS sembra avvenire a livello di fibre nervose che circondano i tessuti linfatici. Infatti si è osservato che intorno alle placche del Peyer è presente una fitta rete di fibre nervose che consente uno stretto contatto tra le cellule che accumulano la PrP^{Sc}, come le FDC e i TBM, e il sistema nervoso (Heggebo et al 2003). A questo livello le fibre nervose prive di mielina favorirebbero una rapida migrazione della PrP^{Sc} verso il SNC.

Vari studi hanno dimostrato che il trasporto della PrP^{Sc} verso il SNC sia possibile per via assonale attraverso i nervi splancnici del sistema nervoso simpatico sia

attraverso quello parasimpatico, attraverso il nervo vago, che sembrerebbe prevalere

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placche di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 26

in caso di contaminazione per via orale (Van Keulen et al., 2000; Van Keulen et al., 2002), giungendo direttamente al midollo allungato, nel NMDV (figura 6).

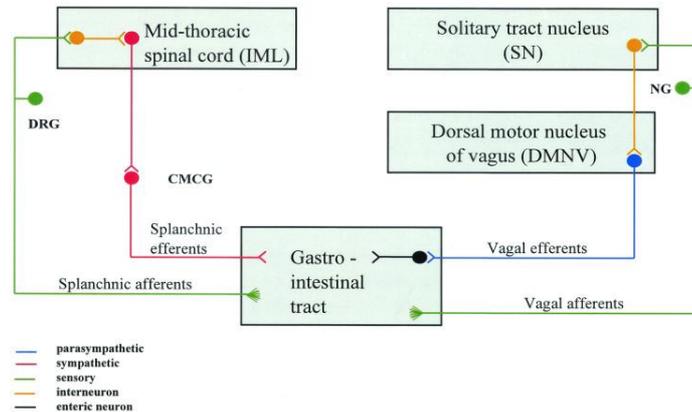


Fig. 6: rappresentazione schematica dei possibili meccanismi di “neuroinvasione” dell’agente infettivo, attraverso le vie nervose che connettono l’intestino al SNC. (Beekes e McBride 2000)

Da quanto osservato nel corso degli studi patogenetici sulla scrapie, in genere la deposizione della PrP^{Sc} a livello del SLR precede la comparsa di lesioni nel SNC e quindi della sintomatologia clinica. L’accumulo della PrP^{Sc} è stato dimostrato nel SLR di pecore con infezione naturale e precisamente a livello di milza, linfonodi e placche del Peyer (van Keulen et al., 1996). La presenza di PrP^{Sc} nella fase preclinica della malattia è stata rilevata già a 4 mesi d’età a livello della tonsilla (Schreuder et al., 1996; 1998) ed a 2,5 mesi nel GALT in pecore con genotipo VRQ/VRQ (Andreoletti et al., 2000). Perciò anche la tonsilla, assieme al GALT, costituisce una delle sedi in cui la proteina patologica si accumula nella fase preclinica della malattia.

A tal proposito, vari autori hanno individuato nella biopsia tonsillare ed in quella palpebrale e rettale un utile sistema diagnostico *intra vitam* per la scrapie (Schreuder et al, 1998; O'Rourke et al., 2000; 2002; Gonzales et al., 2008)

Tuttavia alcuni autori hanno osservato, soprattutto in razze caratterizzate da un genotipo suscettibile ARQ/ARQ, un accumulo di PrP^{Sc} nel SNC ma non nel SLR (Van Keulen et al., 1996; O'Rourke et al., 2000); la stessa situazione è stata riscontrata anche in ovini di razza sarda con lo stesso genotipo, ad ulteriore conferma che molto spesso nella patogenesi della Scrapie si ha una totale assenza di coinvolgimento del SLR (Ligios et al., 2006).

Anche in casi di scrapie atipica si osserva l'assoluta mancanza di coinvolgimento del SLR nel corso della malattia.

Quanto detto finora rende sicuramente poco valida l'applicabilità di un test diagnostico basato sulla presenza di PrP^{Sc} nel distretto linfatico.

L'ulteriore diffusione della PrP^{Sc} nell'organismo avviene probabilmente per via ematica, ma finora non è stato possibile isolare la PrP^{Sc} dal sangue, mentre la sua infettività è stata accertata mediante trasfusioni di sangue infetto sia in esperimenti sulla scrapie che sulla BSE (Huston et al., 2000; Hunter et al., 2002). Inoltre non sono ancora oggi definiti completamente i fattori che determinano la deposizione o meno della PrP^{Sc} nei vari organi e tessuti nonostante la presenza di PrP^C.

Così come suddetto numerosi studi hanno dimostrato la deposizione ectopica della PrP^{Sc} in tessuti extraneuronali ed extralinfatici, quali per esempio muscolatura scheletrica (Andreoletti et al. 2004), placenta (Andreoletti et al., 2002; Tuo et al., 2001; 2002), ghiandole salivari (Vascellari et al., 2007), lingua (Casalone et al., 2004), rene (Siso et al. 2006; Ligios et al., 2007), mammella (Ligios et al., 2005), cute (Thomzig et al., 2007).

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 28

Perché una malattia sia trasmessa orizzontalmente è necessario il suo rilascio nell'ambiente esterno mediante aerosol, escreti e secreti. Il latte, l'urina, la saliva, le feci di animali infetti potrebbero rappresentare importanti fonti contaminanti, ma finora le informazioni sulla loro infettività sono ben poche.

Per quanto riguarda la trasmissibilità, la scrapie mostra in maniera più spiccata rispetto alle altre TSE, le caratteristiche proprie di una malattia infettiva a carattere contagioso, ed è infatti ormai da tempo accertata la trasmissione orizzontale (Greig, 1950; Hourrigan et al., 1979), anche se non si conoscono ancora completamente le modalità con le quali si realizza.

Com'è noto, la PrP^{Sc} può persistere per anni nell'ambiente contaminato, e oramai è opinione comune che la placenta delle pecore infette rappresenti la più importante fonte di contaminazione ambientale. Infatti Pattison (1974) dimostrò che la somministrazione di placente provenienti da pecore infette ad altri soggetti sani, era in grado di determinare in questi ultimi la malattia. Onodera (1992) pur non avendo rilevato con il WB la presenza della PrP^{Sc} nella placenta di due pecore affette da scrapie, osservò che inoculando materiale placentare proveniente da tali soggetti ai topini di laboratorio, questi manifestavano sintomi neurologici riferibili appunto alla scrapie, confermando così l'infettività di tale organo. Saranno i più recenti lavori di Tuo (2002) e Andreoletti (2002) a confermare definire in maniera più precisa il ruolo della placenta nella trasmissione peripartale della scrapie.

E' stato ipotizzato che l'agnello si possa ammalare nella fase peripartale. La trasmissione peripartale è stata suggerita dall'osservazione che agnelli nati da pecore gravide infette contraevano la malattia molto precocemente rispetto ad altri (Dickinson et al., 1976). Foster (1992) mediante il trasferimento di embrioni di 5 – 6

giorni d'età da pecore affette da scrapie a pecore sane, aveva osservato la malattia in
Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica 29
(PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie
naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere
Animale. XXI ciclo.

6 agnelli su 20, affermando quindi che la trasmissione dalla madre alla prole potesse avvenire precocemente. Al contrario in uno studio simile (Foote 1993) non vennero riscontrate casi di scrapie in discendenti ottenuti trasferendo embrioni da pecore donatrici infette a riceventi sane. In seguito in ulteriori esperimenti (Foster et al. 1999; 2004) con un'infezione sperimentale su capre e pecore con l'agente della BSE, si osservò che non si aveva nessuna trasmissione della malattia per via verticale. Studi su agnelli nati da madri affette da scrapie e da madri sane hanno messo in evidenza che non esiste in realtà alcuna differenza nei confronti del rischio di contrarre la malattia. Infatti negli agnelli le prime positività alla PrP^{Sc} sono state osservate a partire da 20 giorni d'età in entrambi i casi, a livello delle placche del Peyer, a dimostrazione del fatto che l'infezione non si verifica per via verticale, ma nel periodo peripartale. (Andreoletti et al., 2002).

LA PLACENTA DEI RUMINANTI

La placenta rappresenta un organo nutrizionale, endocrino ed immunologico che consente la crescita, lo sviluppo e la sopravvivenza del prodotto del concepimento. E' costituita da una porzione di pertinenza fetale, che in tutti gli animali domestici è costituita dal corioallantoide, e da una di pertinenza materna, che deriva dalla modificazione dell'endometrio uterino. Il corioallantoide è a sua volta costituito dall'allantoide, struttura sacciforme che deriva dall'intestino fetale, riccamente vascolarizzata, e dal corion, formato dal mesoderma parietale e dall'epitelio del trofoectoderma (cellule trofoblastiche) che lo riveste esternamente (Schlafer et al. 2000).

L'unità funzionale della placenta fetale è rappresentata dal corion villosa. I villi corionici sono sottili strutture vascolari mesenchimali circondate da cellule trofoblastiche che si estendono sulla superficie del corion e protrudono verso la superficie endometriale. La loro funzione consiste nell'aumentare notevolmente la superficie di scambio materno fetale e avvicinare i vasi fetali (allantoidei) a quelli materni. La distribuzione dei villi corionici varia nelle diverse specie animali.

La placenta dei ruminanti è detta cotiledonare, poiché in tali specie il corion villosa è localizzato in aree definite, dette cotiledoni, che prendono rapporto con le estroflessioni dell'epitelio uterino a livello caruncolare costituendo così i placentomi. La placenta delle pecore possiede circa 90 – 100 placentomi, distribuiti su tutta la superficie del corion, ed intervallati da aree di corion liscio che è semplicemente apposto alla superficie uterina (area interplacentoma) (foto 1; fig.7).

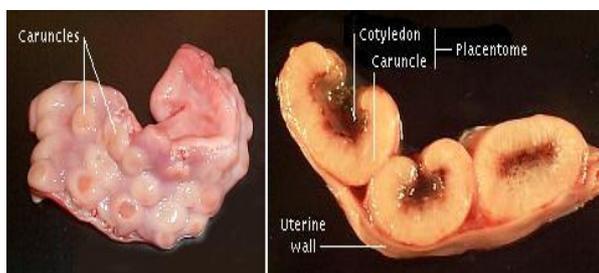


Foto 1: utero gravido di ovino. Si possono osservare i placentomi, costituiti dall'interdigitazione fra caruncola materna e cotiledone fetale, e le zone interplacentomali

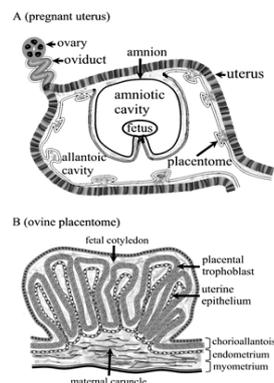


Fig. 7: (a) rappresentazione schematica del feto e dei suoi annessi; (b) del placentoma (Tuo, 2001).

Il trofoectoderma è caratterizzato dalla presenza di due tipi cellulari: i trofoblasti mononucleati, che costituiscono la maggior parte dell'interfaccia materno fetale (Boshier and Holloway, 1977), e sono primariamente coinvolti negli scambi nutritivi, ed i trofoblasti binucleati, che rappresentano il 15 – 20% della popolazione, e sono deputati alla produzione di ormoni quali il lattogeno placentare ed il progesterone (Wimsatt, 1951; Greenstein et al, 1958).

Le cellule mononucleate hanno un aspetto cuboidale, tipico delle cellule epiteliali e sono caratterizzate dalla presenza di un singolo nucleo di forma irregolare, e da un citoplasma ricco di goccioline lipidiche e vescicole di varie dimensioni, che contengono materiale degenerato ((King et al., 1980). Poggiano sulla lamina basale e sono connesse le une alle altre mediante complessi giunzionali, tra cui le tight junctions. (Wooding et al., 1994). La superficie apicale di tali cellule è modificata in modo da formare processi microvillari che si interdigitano con simili processi di provenienza uterina, costituendo così la zona di contatto materno fetale.

Le cellule mononucleate svolgono un ruolo fondamentale nella nutrizione del feto. Inoltre intervengono nel processo di riconoscimento della gravidanza attraverso la produzione di interferone τ (α IFN τ) (Roberts 1999), che impedisce la regressione del corpo luteo mediante la soppressione del rilascio pulsatile di PGF $_{2\alpha}$ da parte dell'endometrio (Flint 1992).

Per quanto riguarda il passaggio di sostanze attraverso la barriera placentare, può avvenire per semplice diffusione (gas e acqua), mediante pompe di trasporto attivo (elettroliti), per diffusione facilitata per mezzo di specifiche molecole carrier (glucosio, aminoacidi), o infine per fagocitosi. E' stato comunque definito un rapido decremento della permeabilità placentare, che esclude molecole di 0.45 nm (Stacey et al, 1977). La fagocitosi, avviene sia nella zona interplacentoma (Schlafer et al., 2000) che nelle aree placentomali. A questo livello, soprattutto a livello delle lacune di riassorbimento ematico nella zona dell'arcata, in prossimità della porzione fetale del cotiledone, le cellule del trofoblasto sono coinvolte nella fagocitosi di macromolecole, e specialmente di eritrociti (Burton et al., 1976; Santos et al., 1996.). Il sangue materno che fuoriesce da capillari e altri vasi sanguigni maggiori (Burton et al., 1976) si accumula nell'interfaccia materno fetale a livello dell'arcata, e va a costituire l'ematofago. Qui oltre agli eritrociti, le cellule del trofoblasto fagocitano anche leucociti materni, cellule epiteliali e cellule giganti circostanti (Myagkaya and Schellens 1981).

Le cellule binucleate rappresentano il 15-20% della popolazione del trofoblasto (Wooding and Wathes 1980; Wooding, 1982). Esse originano dalle cellule mononucleate mediante mitosi acitocinetica (Wimsatt, 1951; Bjorkman, 1968).

Durante le fasi precoci del loro sviluppo, le cellule binucleate sono distribuite in maniera casuale ed in profondità nello strato trofoectodermico, in posizione

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrPSc) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 33

intraepiteliale, così che non hanno contatto né con la membrana basale, né con il bordo apicale del trofoectoderma (Wooding et al., 1984; Wango et al., 1990)

Quando queste cellule maturano, iniziano a migrare verso la giunzione dei microvilli corionici con l'endometrio uterino. Durante questa migrazione le cellule binucleate sono in grado di attraversare le tight junction tra cellule mononucleate adiacenti, senza distruggerle. Il passaggio delle cellule binucleate attraverso le tight junctions termina quando le cellule estendono un prolungamento citoplasmatico apicale che penetra nella tight junction e ne diventa parte integrante (Wango et al., 1990), in questo modo la compartimentalizzazione della componente materna e fetale non è compromessa.

Le cellule binucleate migrano attraverso l'interfaccia materno fetale per fondersi con le cellule epiteliali uterine formando così cellule ibride trinucleate (Wooding et al., 1992; Wango et al., 1990) (fig.8).

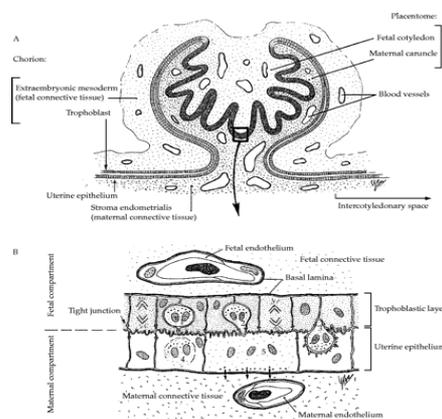


Fig. 8: rappresentazione schematica della struttura del placentoma (A) e della migrazione e fusione delle cellule trofoblastiche binucleate con l'epitelio uterino (B). Andreoletti et al. 2002).

L'espansione delle cellule trinucleate a formare le cosiddette placche sinciziali multinucleate si verifica per la continua migrazione delle cellule binucleate e la fusione in trinucleate (Wooding 1984, 1992). Tale capacità delle cellule binucleate di migrare e fondersi con l'epitelio uterino e dare luogo alle placche sinciziali ha dato origine alla denominazione di placenta sinepiteliocoriale dei ruminanti (Wooding 1992). Nella pecora e nella capra le placche sinciziali perdurano per tutta la gravidanza. Esse aumentano di dimensione a causa della continua migrazione e fusione delle binucleate, fino ad arrivare a celle con anche 25 nuclei.

SCOPO DEL LAVORO

Scopo del presente lavoro è indagare sul ruolo che lo stadio di gravidanza, la fase della malattia (preclinica/clinica) ed il genotipo del feto possono avere sulla deposizione di PrP^{Sc} a livello della placenta di pecore di razza sarda con genotipo ARQ/ARQ affetti da scrapie naturale e sperimentalmente.

Inoltre, alla luce della recente descrizione di ulteriori polimorfismi in grado di modulare la sensibilità/resistenza alla malattia nei soggetti con genotipo ARQ/ARQ, è stata svolta un'indagine sulla relazione tra la deposizione della PrP^{Sc} a livello placentare e l'eventuale presenza di tali mutazioni aggiuntive del gene *PRNP*.

MATERIALE E METODI

CAMPIONAMENTO

Pecore asintomatiche da allevamenti colpiti da scrapie. Una parte del nostro studio è stato effettuato in tre greggi di razza sarda naturalmente affetti da scrapie (tabella 4) dove si è proceduto ad effettuare un prelievo di sangue in EDTA da tutti i capi presenti in allevamento, dal quale veniva estrato il DNA per all'esame del genotipo ai codoni 136, 154 e 171. Tutti gli animali risultati con genotipo sensibile al codone 171 (QQ) sono stati abbattuti secondo quanto previsto dai programmi di eradicazione della malattia. Su una parte di questi soggetti (n.134, tabella 4) scelti a random al momento dell'abbattimento sono stati prelevati: midollo allungato (che comprendeva l'obex) e cervelletto, linfonodi retrofaringei, utero gravido, utero vuoto. Dagli uteri gravidi sono stati prelevati 3 - 4 placentomi da ogni soggetto (in caso di gravidanza gemellare si è proceduto al prelievi dei placentomi afferenti ad ogni feto) ed una porzione interplacentomale a tutto spessore della parete. Ciascun campione è stato suddiviso in due parti, una è stata fissata in formalina tamponata al 10% per l'esame istologico ed immunoistochimico mentre l'altra è stata congelata a -20°C per l'esame immunobiochimico. Le due parti del midollo allungato ed il cervelletto erano ottenute applicando un taglio saggittale mediano sui due organi. Da ciascun feto era inoltre prelevata la milza che veniva congelata ed utilizzata per la estrazione di un campione di DNA sul quale effettuare il sequenziamento del gene *PRNP* qualora il genotipo ai codoni 136, 154 e 171 dei feti ARQ/ARQ e delle loro madri.

In sede di abbattimento si è proceduto al campionamento rispettivamente di 52, 36 e 46 soggetti con genotipo suscettibile ARQ/ARQ.)

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 37

I campioni di emicervello e tessuto linfatico sono stati sottoposti al test rapido ufficiale per la diagnosi di TSE (test Elisa Biorad e Check Western Prionics) in base alla normativa vigente.

I campioni di utero (placentoma, porzione interplacentoma, porzione caruncolare ed intercaruncolare) provenienti dai soggetti positivi al test rapido sono stati esaminati mediante esame immunoistochimico e western blotting modificato per la evidenziazione della PrP^{Sc}.

Per la valutazione dell'età del feto sono state utilizzate le chiavi morfometriche suggerite da Bruni Zimmerl (Anatomia degli animali domestici, 1992) e Hafez (Reproduction in farm animals, 2000), in base alle quali gli stessi venivano distribuiti all'interno di tre periodi: precoce (40 - 70 giorni), intermedio (70 - 120 giorni) e terminale terminale (140 - 150 giorni).

Pecore affette da scrapie naturale clinicamente manifesta. Ventinove soggetti di razza sarda di età compresa fra 2 e 5 anni, con sintomatologia indicativa di scrapie, provenienti da cinque greggi focolaio di malattia individuati nel corso dei programmi di sorveglianza passiva per le TSE, sono stati esaminati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna. Da ciascun soggetto è stato prelevato il cervello e vari distretti linfatici. I campioni sono stati divisi in due parti delle quali una veniva fissata in formalina tamponata al 10% e l'altra congelata a - 20° C. In tutti i soggetti gravidi si procedeva ad un campionamento del feto e dell'utero similmente a quanto su-descritto per i capi asintomatici.

Pecore affette da scrapie sperimentale clinicamente manifesta. In questo studio sono stati inclusi 11 soggetti di razza sarda ARQ/ARQ infettati sperimentalmente (nell'ambito di un più ampio esperimento programmato per lo studio sulla patogenesi

della scrapie) a 20 gg di età con 25 ml di un omogenato al 10% ottenuto da un pool
Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica 38
(PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie
naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere
Animale. XXI ciclo.

di cervelli di ovini positivi alla PrP^{Sc}. Al fine di determinare il ruolo del polimorfismo al codone 141 e 176, le 11 pecore, al raggiungimento della maturità sessuale, sono state accoppiate naturalmente con due arieti uno AF₁₄₁RQ/AL₁₄₁RQ e l'altro ARQN₁₇₆/ARQK₁₇₆.

Le placente degli 11 soggetti espulse al momento del parto sono state raccolte dalle lettiera entro 12 ore dall'espulsione e, dopo abbondante lavaggio in soluzione fisiologica, per eliminare terra e altri detriti, i cotiledoni sono stati divisi in due parti di cui una veniva fissata in formalina tamponata al 10% per gli esami immunostochimici, e l'altra congelata a -20°C per gli esami di western blotting. Al fine di conoscere il genotipo del *PRNP* da tutte le placente raccolte veniva estratto il DNA da sottoporre al sequenziamento.

Nella fase terminale della malattia tutti gli 11 capi venivano sacrificati e sottoposti al campionamento del cervello, organi linfatici e utero secondo quanto precedentemente descritto.

ANALISI PER LA RICERCA DI PrP^{Sc}

Western Blotting

Trattamento con collagenasi. I campioni di tessuto fresco o congelato sono stati pesati (0.5 gr di tessuto nervoso, 1 gr di tessuto linfatico, 1 gr di tessuto uterino o placentare) e sminuzzati finemente. Mentre il tessuto nervoso è stato posto immediatamente in tampone di omogeneizzazione (tampone Prionics, concentrazione 10%), sia il linfonodo che utero e placenta sono stati sottoposti ad un precedente trattamento in collagenasi A (Roche) (0.25% w/v) per 2 – 3 h a 37° C in agitazione costante. I campioni sono stati centrifugati a 30.000 g per 30' a 4°C, e ciascun pellet

è stato risospeso, in tampone di omogeneizzazione (0.01 M tris HCl, 0.15 M NaCl, Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 39

5mM EDTA pH 8, 1% Triton x 100, 0.5% sodio deossicolato) ad una concentrazione del 20% per tessuto linfatico, utero, placenta e del 10% per il tessuto nervoso).

Su ciascun campione è stato effettuato un debris mediante centrifugazione a bassa velocità (500g per 10 minuti a 2°C) per eliminare il materiale grossolano.

Digestione con Proteinasi K. Ogni campione omogenato è stato suddiviso in 5 aliquote da 1 ml in eppendorf e sottoposto a digestione in termoblocco per 60 minuti a 49°C con 200 µg/ml di proteinasi K. Al termine della digestione l'attività della proteinasi K è stata interrotta mediante denaturazione con Fluoruro di fenilmetansulfonile (PMSF).

I campioni sono stati quindi centrifugati a 30000 g per 30 minuti a 4°C, ed i pellet risospesi in loading buffer, denaturati a 95°C.

Elettroforesi. Successivamente i campioni sono stati caricati su gel Nu-Page 12% bis-tris e sottoposti ad elettroforesi in SDS Page. La corsa elettroforetica è stata eseguita ad un potenziale elettrico costante di 120 V per 90 minuti.

Blotting e rivelazione immunologia. Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrane polyvinylidene fluoride (PVDF, Millipore 0.45 µm) mediante applicazione di un voltaggio pari a 150 V per 1 ora.

La presenza di PrP^{Sc} è stata rilevata mediante incubazione overnight a temperatura di 4 °C in statica con l'anticorpo monoclonale P4 (R-Biopharm), diluito 1:25000. Al termine dell'incubazione la membrana è stata sottoposta a vari lavaggi in TBS Tween (10 mM Tris HCl pH7.8, 100mM NaCl, 0.05% Tween 20), ed incubata con l'anticorpo secondario antimouse IgG coniugato con fosfatasi alcalina, diluito 1:5000, per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione continua.

Il PVDF è stato di seguito lavato più volte in TBS-T, incubato in buffer di chemiluminiscenza per 8 minuti e con il substrato CDP-Star per 1 – 3 minuti.

Le bande proteiche sono state rilevate mediante impressione della lastra autoradiografica per 5 – 20 minuti.

ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

La metodica di seguito descritta è stata utilizzata per evidenziare i depositi di Prp^{sc} a carico dell'obex, cervelletto, linfonodo retrofaringeo, utero e placenta utilizzando l'anticorpo monoclonale primario F99, e per evidenziare la citocheratina espressa dai trofoblasti mononucleati della placenta (anticorpo anti citocheratina tipo II).

Immunoistochimica

Preparazione dei campioni e smascheramento. I tessuti fissati in formalina tamponata al 10% inclusi in paraffina, sono stati tagliati al microtomo in sezioni di 4/5 μ e asciugati in termostato a 37°C per almeno 24 h. Dopo un processo di deparaffinamento e reidratazione in alcool a concentrazione decrescente, le sezioni ottenute sono state trattate con acido formico per 2 minuti e sottoposte ad un ciclo di autoclavaggio in tampone citrato a 120°C per 3 minuti al fine di smascherare i siti antigenici celati. Dopo il raffreddamento i campioni sono stati lavati in acqua distillata, ed immersi in PBS-Tween per 5 minuti.

Blocco perossidasi endogene. Il blocco delle perossidasi endogene è stato eseguito mediante trattamento con perossido di idrogeno al 3% per 5 - 10 minuti in camera umida a temperatura ambiente.

Digestione. I campioni sono stati lavati in H₂O distillata e PBS Tween e sottoposti a due trattamenti successivi con Proteinasi K (10 microgr/ml) per 5 minuti. La

funzione della Proteinasi è quello di distruggere la forma cellulare della PrP in Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 41

maniera da rendere selettivo il legame dell'anticorpo con la forma patologica. Ad oggi ancora non esiste un anticorpo anti PrP^{Sc} specifico, che non si leghi anche alla forma normale della proteina.

Tamponamento siti aspecifici e rivelazione immunologia. I siti aspecifici sono stati tamponati mediante trattamento con siero non immune di cavallo per 20 minuti in camera umida a temperatura ambiente, ed in seguito le sezioni sono state ricoperte con l'anticorpo monoclonale primario F99, alla diluizione di 1:800. L'incubazione è stata eseguita in termostato a 37°C per 60 min in camera umida.

Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario biotinilato (anti-rabbit/mouse IgG, Vectastain) per 30 minuti in una camera umida a temperatura ambiente e lavate nuovamente.

Per l'amplificazione della reazione è stato usato il sistema ABC Complex (Vectastain), basato sull'elevata affinità tra la streptavidina marcata con perossidasi e la biotina coniugata all'anticorpo secondario.

La rilevazione della reazione anticorpale è stata effettuata mediante 3, 3' Diaminobenzidina (DAB, Dako) per 2 – 5 minuti, e contrastata mediante Emallume di Mayer per 20- 35 secondi.

Infine i preparati sono stati disidratati in alcool a concentrazione decrescente e montati con balsamo e vetrino coprioggetto. Si è quindi proceduto all'osservazione al microscopio ottico.

Doppia immunoistochimica. E' stata utilizzata una doppia colorazione in immunoistochimica per evidenziare con maggior chiarezza la localizzazione della deposizione di PrP^{Sc} a livello placentare, mettendo in evidenza i diversi componenti cellulari che si interfacciano a livello placentare.

Nella prima fase della metodica si è proceduto come descritto precedentemente, per mettere in evidenza la PrP^{Sc}.

Dopo il trattamento di rivelazione della prima reazione con il DAB, le sezioni sono state nuovamente lavate in acqua distillata e PBS Tween e ricoperte nuovamente con siero non immune di cavallo per 20', per eliminare i legami aspecifici. Per l'evidenziazione delle cellule trofoblastiche è stato utilizzato l'anticorpo anticitocheratina di tipo II AE3 (ABD Serotec), che si lega in maniera specifica alle cellule uninucleate, e solo parzialmente alle cellule multinucleate di origine sinciziale. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario (1 ora a 37°C in camera umida), i campioni sono stati lavati, ed incubati con l'anticorpo secondario biotinilato (Dako Real Link) per 20 minuti a temperatura ambiente. Si è proceduto quindi all'incubazione con il complesso Streptavidina – Fosfatasi alcalina (Dako Real Link) per 20 minuti, ed infine alla rilevazione con Fast Red (Dako) e contrasto con Emallume di Mayer. Dopo il montaggio con montante acquoso si è proceduto all'osservazione al microscopio ottico.

ANALISI GENETICHE

La determinazione del genotipo ai codoni 136, 154 e 171 del gene della PrP è stata eseguita sia nelle pecore che nei feti con la discriminazione allelica con sonde fluorescenti TaqMan che permette l'identificazione delle singole sostituzioni ai codoni menzionati.

Per una determinazione completa della sequenza dell'intero gene è stata utilizzata invece una tecnica di sequenziamento diretto in sequenziatore automatico.

Discriminazione allelica TaqMan

L'analisi del gene è stata effettuata a partire da sangue ovino prelevato in EDTA o da altro tessuto.

Estrazione di DNA

Estrazione di DNA da sangue con NaOH - L'estrazione è stata condotta a partire da 30µl di sangue totale. Il sangue intero è stato trattato con 1ml di tampone salino (NaCl 10mM e EDTA 10mM) in successivi lavaggi (centrifugazione a 3000g e risospensione del pellet in tampone salino), fino ad ottenere un pellet bianco e privo di emoglobina. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 50µl di NaOH 200mM e fatto incubare per 2 ore a 65°C. Il pH è stato neutralizzato con 50µl di una soluzione di Tris HCl 200mM e HCl 400mM in rapporto 1:1. Dopo centrifugazione a 3000g per due minuti sono stati raccolti circa 10ng/µl di DNA.

Estrazione da sangue o tessuto con Kit Dneasy Tissue Qiagen- L'estrazione è stata eseguita da 25 mg di tessuto o da 100µl di sangue intero prelevato in EDTA. I campioni sono stati digeriti in buffer di lisi ATL e proteinasi K per 10 minuti (sangue) o overnight (tessuto).

Il metodo di estrazione del kit sfrutta la capacità della silice estratta dai gusci di diatomee di legare elettrochimicamente le molecole di DNA liberate dalle cellule dopo il trattamento con il buffer di lisi. Ulteriori passaggi con buffer di lavaggio, e per ultimo con un buffer di eluizione, hanno permesso di ottenere un DNA purificato da ogni residuo cellulare di natura lipidica e proteica. La sua concentrazione finale è di circa 10ng/µl partendo da sangue e circa 50ng/µl partendo da organo.

Reazione di PCR. Il DNA (30 ng) è stato amplificato mediante 4 differenti PCR Real Time multiplex, utilizzando primers specifici e sonde MGB (Applied Biosystems).

Per ogni codone, la coppia di sonde MGB-TaqMan marcate ognuna con un fluoroforo differente (VIC e FAM) identifica il nucleotide ricercato, discriminando una sequenza che differisce per un singolo nucleotide. Per il codone 171, essendo tre le possibili variabili, vengono effettuate due distinte PCR.

La soluzione di amplificazione del target relativo a ciascun codone è stata preparata sostituendo per ogni codone, primers e sonde specifiche. La mix di 25 µl per ogni PCR era costituita da 30 ng di DNA genomico, 900 nM di primers, 200 nM di sonde MGB, e 12.5 µl di PCR TaqMan 2X Mastermix (Applied Biosystem).

Per ciascun codone analizzato sono stati inseriti i campioni di controllo costituiti da DNA di genotipo noto per quel codone e un controllo negativo.

Ciclo di reazione. Le quattro reazioni di amplificazione sono state eseguite alle seguenti condizioni: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, e 35 ripetizioni a 95°C per 15 secondi, e 60°C per 1 minuto in GeneAmp® PCRSystem 9700 (Applied Biosystem).

Sequenza nucleotidica di primers e sonde. Per il codone 136 sono stati usati i primers F136 5'-GATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGC-3' e R136 5'-CTGCAGCTGGAGCAGGGTA-3', e le sonde MGB A136 (FAM) 5'-TCATGgCACTTCC-3' per il codone che codifica per la A, e V136 (VIC) 5'-CTCATGaCACTTCC-3' per il codone che codifica per la V.

Per il codone 154 sono stati utilizzati i primers F154 5'-TGGCAATGACTATGAGGACCG-3' e R154 5'-

TGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGG-3', e le sonde MGB R154 (FAM) 5'-ACTATCgTGAAAACAT-3' per il codone che codifica per la R e H 154 (VIC) 5'-TACTATCaTGAAAACATG-3' per il codone che codifica per la H. Per il codone 171 sono state eseguite due distinte PCR Real Time multiplex. Nella prima amplificazione sono stati utilizzati i primers F171 5'-GTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGA-3' e R171 5'-TGTTGACACAGTCATGCACAAA-3', e le sonde MGB R171 (FAM) 5'-CCAGTGGATCgGTATA-3' per il codone che codifica per R e H171 (VIC) 5'-ACCAGTGGATCaTAT-3' per il codone che codifica per la H.

Nella seconda amplificazione invece sono stati usati gli stessi primers (F171 e R171) e le sonde MGB R171 (FAM) 5'-CCAGTGGATCgGTATA-3' per il codone che codifica per R e Q171 (VIC) 5'-ACCAGTGGATCaGTATA-3' per il codone che codifica per Q.

Analisi dei risultati della reazione di PCR. La lettura dei risultati è stata effettuata in ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). I risultati sono visibili come punti distribuiti su un piano cartesiano in funzione del tipo (colore della fluorescenza emessa, VIC o FAM) e della quantità della fluorescenza emessa.

A seconda del genotipo dei campioni, si costituiscono 4 gruppi separati di punti:

1. uno all'origine degli assi con coordinate (0,0) o molto prossime a tali valori.
2. uno di punti con coordinate (0,y), dislocato lungo l'asse delle y.
3. uno di punti (0,x), dislocato lungo l'asse delle x.
4. un quarto con punti di coordinate (x,y), dislocato lungo la bisettrice degli assi cartesiani.

Sequenziamento diretto del gene

Estrazione del DNA con Kit Qiagen. Le modalità di estrazione del DNA sono state descritte per il test di discriminazione allelica.

Controllo del DNA estratto. Il controllo qualitativo e quantitativo del DNA estratto è stato effettuato su gel di agarosio allo 0,8% utilizzando un marker di peso molecolare ladder, e due di concentrazione 50ng/ml e 100ng/ml. Per la corsa elettroforetica il DNA è stato diluito 1:4 per un volume totale di 20µl (5 µl di DNA e 15 µl di acqua milliq).

Reazione di PCR. La PCR è stata eseguita in 50 µl totali di reazione contenente 10 ng di DNA genomico, 10 mM Tris/HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 250 µM di ciascun deossinucleotide trifosfato (Applied Biosystems), 1U di Taq Gold DNA polimerasi (Applied Biosystems), e 1 µM per ciascun primer (senso e antisenso).

Sequenza dei primers. La reazione di amplificazione dell'ORF che codifica per la PrP ovina è stata condotta utilizzando una coppia di primers disegnati sulla sequenza del gene umano, nelle regioni fiancheggianti che amplificano un tratto genico della lunghezza di ~800 bp. La loro sequenza è:

pCWD F: 5'-CAGGTTAACACCCTCTTTATTTTGCAG-3' e

pCWD R: 5'- ACCTCTAGAAGATAATGAAAACAGGAAG-3'.

Ciclo di PCR. L'amplificazione è stata eseguita alle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti, 30 cicli a 95°C per 30 secondi, 58 °C per 30 secondi, 72°C per 45 secondi. Infine 72 °C per 7 minuti.

Controllo dei prodotti di PCR. Gli amplificati ottenuti dalla reazione di PCR sono stati controllati qualitativamente in gel di agarosio al 2% utilizzando un marker Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

molecolare VIII. Ogni amplificato è stato diluito 1:4 per un volume totale di 20 μ l (5 μ l di amplificato e 15 μ l di acqua milliQ).

Purificazione dei prodotti di PCR. La purificazione degli amplificati dai residui di primers e nucleotidi è stata effettuata per via enzimatica mediante Exosap-It (Amesharm Biosciences). 2 μ l di Exosap è stato aggiunto a 5 μ l di amplificato e tutto è stato sottoposto a 37°C per 15 minuti e 80°C per 15 minuti in termalcycle.

Reazione di sequenza. Per la reazione è stato utilizzato un solo primer di amplificazione (pCWD F per lo strand forward, pCWD R per quello revers). A tutto il prodotto di purificazione ottenuto sono stati aggiunti 2 μ l di Big Dye Terminator Mastermix (Applied Biosystems) più 1 μ l di Primer (R o F) alla concentrazione di 1,7 μ M. La reazione è stata eseguita a 96°C per 10 secondi, e 25 cicli a 57°C per 5 secondi, 60°C per 2 minuti in termalcycle.

Purificazione della reazione di sequenza. Per la purificazione sono state utilizzate piastre da filtrazione sottovuoto da 96 pozzetti dotate di membrane Durapore (PVDF) a basso assorbimento proteico che presentano dei pori di diametro 0,45 μ m (Millipore). Tutto il prodotto di sequenza è stato caricato nel pozzetto della piastra e sottoposto a 1700 rpm per due minuti.

Denaturazione dei tratti di DNA. Le doppie catene di DNA ottenute dalla reazione di sequenza sono state separate aggiungendo a 5 μ l di prodotto di reazione 2 μ l di Hi-Di Formamide (Applied Biosystems). La reazione di denaturazione è stata condotta in termalcycle a 95°C per 2 minuti.

Elettroforesi e analisi dei aerogrammi. L'elettroforesi dei prodotti di sequenza è stata condotta in sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 Genetic AnaLyzer (Applied Biosystems) a 16 capillari.

Ciascuna sequenza ottenuta è stata allineata e confrontata con la sequenza del gene della PrP di pecora sarda depositata in GenBank con numero di riferimento AF195247, utilizzando il programma Mutation Surveyor.

Clonazione degli alleli

Per identificare l'associazione fra diversi polimorfismi e la loro appartenenza all'uno o all'altro allele, è stata effettuata la clonazione dei singoli alleli del gene per la PrP in plasmide. Per l'esperimento sono stati scelti 17 campioni di DNA che al sequenziamento sono risultati portatori di due differenti mutazioni in forma eterozigote.

La clonazione dei singoli alleli è stata effettuata utilizzando il protocollo del "TOPO TA Cloning® Kit" (Invitrogen) in cellule di *E. coli* (TOP10 One Shot competent cells, Invitrogen).

La selezione dei cloni si è basata sulla resistenza all'ampicillina delle colonie batteriche trasformate. Per ogni campione sono stati selezionati 5 cloni.

Il DNA plasmidico dei cloni selezionati è stato estratto in accordo con il protocollo del "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche) e sequenziato seguendo la stessa procedura descritta per il DNA genomico bicatenario.

RISULTATI

Pecore asintomatiche da allevamenti colpiti da scrapie. La percentuale dei soggetti con genotipo sensibile rilevata e la prevalenza della scrapie subclinica riscontrate nei 3 greggi oggetto dell'indagine sono riassunte nella tabella (tabella 4).

Delle complessive 134 pecore abbattute ed esaminati per PrP^{Sc} a livello del SNC e SLR mediante WB e IHC, 23 (17,16%) hanno evidenziato accumuli di PrP^{Sc} a carico di uno o entrambi i tessuti (Tabella 5).

In particolare 16 soggetti (69,56%) presentavano positività sia a carico del SNC centrale che del SLR, 2 (8,69%) erano positivi solo al SNC (obex) e 5 (21,73%) solo al SLR (linfonodo retrofaringeo), i risultati ottenuti con il WB erano sovrapponibili a quelli osservati con l'IHC (tabella 5).

Dei 23 soggetti positivi alla malattia, 13 erano gravidi, tra 60 e 140 giorni di gestazione, mentre 10 erano vuoti (tabella 5). Tra questi ultimi, sono stati identificati un soggetto impubere, ed uno che aveva partorito da pochi giorni, e presentava ancora residui placentari nell'utero, i rimanenti 8 presentavano un utero completamente involuto.

Il reale stadio di sviluppo della malattia allo stadio preclinico, è stato definito mediante la valutazione della presenza o meno di lesioni spongiformi e del profilo immunoistochimico di deposizione di PrP^{Sc} a livello di obex. Il pattern immunoistochimico rilevato è descritto nella tabella 6.

Dal profilo immunoistochimico si può affermare che in 8 soggetti, con pattern a livello dell'obex caratterizzato da lieve deposizione di PrP^{Sc} a carico soprattutto del nucleo motore dorsale del vago (NMDV), e dall'assenza di lesioni spongiformi, la

malattia era ancora in uno stadio presintomatico (foto 2A). Tre soggetti, che
Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica 50
(PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie
naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere
Animale. XXI ciclo.

presentavano lesioni spongiformi, oltre ad un'abbondante deposizione di PrP^{Sc} a carico di tutti i nuclei dell'obex (motore dorsale del vago, dell'ipoglosso, del trigemino, del tratto solitario, nuclei olivari) e della sostanza reticolare, si trovavano in uno stadio terminale preclinico (foto 2B). Due soggetti che presentavano PrP^{Sc} esclusivamente nel SLR sono stati considerati allo stadio preclinico iniziale della malattia (foto 2C) (Tabella 5 e 6).

L'analisi genetica eseguita sui feti delle pecore gravide affette da scrapie ha permesso di evidenziare che 10 presentavano genotipo ARQ/ARQ con o senza ulteriori mutazioni, mentre gli altri avevano un genotipo ARQ/ARR (tabella 5).

Pecore affette da scrapie naturale clinicamente manifesta. Le 29 pecore esaminate presso il nostro laboratorio presentavano sintomatologia clinica riferibile a scrapie, caratterizzata da atassia, tremori, prurito, dimagrimento, perdita di lana, rigurgito di materiale ruminale. Dodici dei 29 capi sacrificati erano gravidi (90 – 140 giorni), mentre gli altri 17 soggetti erano vuoti. La presenza della malattia è stata confermata mediante WB e IHC sia a carico del SNC che del SRL. Mediante IHC eseguita su diversi distretti dell'encefalo si è osservato in tutti i soggetti la presenza di abbondanti depositi di PrP^{Sc} con un pattern di deposizione assolutamente sovrapponibile tra i vari soggetti. In tutti i capi erano presenti importanti lesioni spongiformi.

L'analisi genetica eseguita sui feti delle pecore gravide affette da scrapie ha permesso di evidenziare in 4 un genotipo ARQ/ARQ_{wildtype} ed in 10 un genotipo ARQ/ARR (tabella 7).

Deposizione PrP^{Sc} a livello placentare ed uterino in pecore asintomatiche o clinicamente affette da scrapie.

Nei feti con genotipo ARQ/ARR non sono stati evidenziati depositi di PrP^{Sc} a carico della placenta, sia nelle pecore allo stadio preclinico che in quelle sintomatiche (tabella 5 e 7).

Tra le 10 pecore preclinicamente affette da scrapie e gravide la PrP^{Sc} era osservata nelle placentate con feti ARQ/ARQ_{wildtype} (n. 3) ma non in quelle con feti ARQ/ARQ con ulteriori mutazioni ai codoni 141 e 176 (tabella 5). Delle pecore gravide affette da scrapie e con sintomatologia clinica tutte quelle con i feti ARQ/ARQ avevano una placenta positiva per la presenza di PrP^{Sc} (tabella 7).

Una gravidanza gemellare è stata rilevata in due soggetti, uno sintomatico ed uno asintomatico entrambi a 90 – 100 giorni di gestazione. Nel soggetto sintomatico la deposizione di PrP^{Sc} è stata identificata nei placentomi di entrambi i feti che avevano il genotipo ARQ/ARQ_{wildtype}. Il soggetto asintomatico (# B150, tabella 5) ha presentato accumulo di PrP^{Sc} nei placentomi nel feto con il genotipo ARQ/ARQ_{wildtype} ma non in quelli del rimanente feto AF₁₄₁RQ/AL₁₄₁RQ (tabella 5).

In nessuno dei soggetti gravidi esaminati è stata rilevata la deposizione di PrP^{Sc} a livello del corion allantoide interplacentomale.

L'anticorpo anti-citocheratina tipo II si è rivelato specifico esclusivamente per le cellule trofoblastiche mononucleate (foto 3A). Con la doppia colorazione di immunoistochimica nella quale venivano utilizzati sia l'anticorpo anti- PrP^{Sc} (F99) che quello anticitocheratina tipo II si osservava una co-localizzazione dei due segnali nelle cellule mononucleate trofoblastiche (foto 4B) mentre nelle cellule multinucleate di origine sinciziale e nelle cellule epiteliali endometriali si osservava solo una reazione positiva verso l'F99 indicando la deposizione di PrP^{Sc} (foto 4A,

foto 3B) . A carico delle cellule binucleate, elementi cellulari caratteristici della placenta dei ruminanti non sono mai stati osservati depositi di PrP^{Sc} (foto 3B)

La PrP^{Sc} nella fase precoce di gravidanza è principalmente localizzata nella porzione basale ed in quella intermedia del placentoma e presenta un aspetto granulare, con granuli più o meno grossolani, isolati o confluenti, e formazioni simil-placca, di media estensione (foto 4 A).

Infine, due soggetti sintomatici e due asintomatici sono stati sacrificati a circa 140 giorni di gestazione. Nei placentomi prelevati in questa fase si è osservato che la PrP^{Sc} tendeva a depositarsi nella porzione più apicale del placentoma, in prossimità della zona dell'ematofago placentare mentre tendeva a diminuire nella porzione basale.

In tutti i casi esaminati, sia nei soggetti sintomatici che in quelli asintomatici la deposizione della PrP^{Sc} non era estesa uniformemente a tutto il placentoma, ma caratterizzata da depositi multifocali disseminati nella struttura (foto 3B).

Non è stato osservato un aumento della quantità di PrP^{Sc} con l'avanzare della gravidanza. I campioni di placentoma prelevati a 90-100 giorni presentano una quantità di PrP^{Sc} decisamente paragonabile a quelli prelevati a fine gravidanza. La deposizione maggiore, con granuli fini o grossolani, abbondanti, e talvolta confluenti, è stata rilevata in un soggetto asintomatico a circa 100 giorni di gravidanza. In questo soggetto (# B150, tabella 5), con una gravidanza gemellare in corso, la totalità dei depositi di PrP^{Sc} è stata individuata solo nei placentomi afferenti ad un feto ARQ/ARQ_{wildtype}, mentre l'altro, AF₁₄₁RQ/AL₁₄₁RQ era totalmente negativo.

Nei soggetti non gravidi sintomatici o asintomatici non è mai stata evidenziata alcuna positività a carico dell'utero sia mediante WB che IHC.

Soggetti infettati sperimentalmente con la scrapie.

Tutte le 11 pecore hanno partorito in media 575 giorni dopo l'inoculazione. La malattia ha raggiunto la fase terminale dopo una media di 76 giorni dall'esordio della sintomatologia che è avvenuto in corrispondenza del periodo peripartale. Al momento del decesso la patologia è stata confermata mediante WB ed IHC sia nel SNC che nel SLR.

Con l'IHC abbondanti depositi di PrP^{Sc} sottoforma di granuli erano osservati, nonostante fossero presenti avanzati stati di autolisi, nel citoplasma dei trofoblasti delle placenti in 8 soggetti, tutti con agnelli di genotipo ARQ/ARQ_{wildtype} (foto 5 A e B). Negli stessi soggetti non era osservata nessuna presenza di PrP^{Sc} nell'area intercotiledonare. Gli esami di WB confermavano questi risultati nonostante la placenta raccolta dalla lettiera fosse in preda ad avanzati stati di autolisi. Gli esami di WB e di IHC risultavano completamente negativi nella placenta di altre 3 pecore che avevano partorito agnelli con genotipo ARQ/ARQ contenente mutazioni ai codoni 141 e 176 (tabella 8, Figura 9).

Tutti gli uteri esaminati sono risultati negativi alla ricerca di PrP^{Sc} sia al WB che all'IHC (foto WB).

DISCUSSIONE

Presenza di PrP^{Sc} nell'apparato riproduttore di soggetti gravidi. Nel presente studio è stata svolta un'indagine sul ruolo che lo stadio di gravidanza, la fase (preclinica/clinica) della malattia ed il genotipo del feto possono avere sulla deposizione di PrP^{Sc} a livello della placenta sia in soggetti con scrapie naturale che in soggetti infettati sperimentalmente.

I nostri risultati suggeriscono che l'accumulo di PrP^{Sc} nell'apparato riproduttore sia gravidanza-dipendente ed inoltre confermano, ed aggiungono ulteriori conoscenze, a quanto osservato precedentemente da altri autori a proposito dell'importanza che il genotipo del feto riveste nella deposizione di PrP^{Sc} a livello placentare (Tuo et al, 2002; Andreoletti et al, 2002; Caplazi et al, 2004; Ersdal et al, 2005; Alverson et al. 2006; Lacroux et al, 2007). Infine il nostro lavoro evidenzia quanto la fase della malattia della madre influisca sulla deposizione di PrP^{Sc} nella placenta, essendo la fase clinica il momento dove questo avvenimento è maggiormente probabile.

Il meccanismo per il quale tale deposizione si verifica solo in gravidanza non è ancora conosciuto. A tale proposito alcuni ricercatori (Tuo et al. 2001; Horiuki et al 1995) hanno valutato la distribuzione e la quantità della PrP^C cellulare nel tratto riproduttivo di pecore gravide e non gravide. Essi hanno osservato che le cellule dell'endometrio caruncolare e intercaruncolare, del miometrio, dell'ovidotto e dell'ovaio di pecore gravide e vuote esprimono la PrP^C in quantità sovrapponibile.

Durante la gravidanza è stato osservato che il corion allantoide cotiledonare e l'endometrio caruncolare materno iper-esprimono la PrP cellulare, con un incremento 4 volte maggiore rispetto alla quantità presente nell'endometrio

caruncolare delle pecore non in gestazione e del corion allantoide intercotiledonare
Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 55

delle pecore gravide (Tuo et al., 2001). Questo suggerisce che probabilmente l'intimo contatto esistente tra le popolazioni cellulari materno-fetali o la presenza di molecole sintetizzate ed espresse dal corion allantoide cotiledonare o la produzione di ormoni associati alla gravidanza possono avere un ruolo importante nella regolazione della sintesi di PrP^C. Come conseguenza finale dell'aumento della espressione di PrP^C si avrebbe l'accumulo di PrP^{Sc} in corso di gravidanza.

Secondo quanto riportato da Tuo et al. (2001) anche ovaio e ovidotto esprimono PrP^C, ma in nessuno dei due organi è stato evidenziato l'accumulo di PrP^{Sc}. In realtà Hourrigan (1990) riporta un dato discordante, evidenziando infettività prionica in 4 ovaie (4/14 capi analizzati) di soggetti di cui non si conosce però lo status riproduttivo.

La presenza di infettività prionica nella placenta di capre e pecore affette da scrapie è nota da tempo e la sua infettività è stata dimostrata mediante prova biologica su capra, topo e ovino (Pattison et al., 1972, 1974; Onodera et al., 1993). Nonostante questa conoscenza fosse acquisita restava da capire come mai la placenta potesse essere positiva in una gravidanza e negativa in quella successiva (Race et al., 1998).

La comprensione di tale fenomeno risale ai lavori di Tuo et al. (2002) e Andreoletti et al. (2002) i quali, mediante appropriati accoppiamenti tra pecore affette da scrapie e arieti sensibili o resistenti alla malattia, hanno ottenuto agnelli con genotipo suscettibile o resistente. Tuo et al. (2002) riportano l'assenza di PrP^{Sc} nella placenta di 6 pecore di razza Suffolk ARQ/ARQ con feti ARQ/ARR mentre riscontra la positività in quella di 10 soggetti ARQ/ARQ, sempre della stessa razza, con feti suscettibili alla malattia. Andreoletti et al. (2002) confermano gli stessi risultati in soggetti di razza Romanov, la cui sensibilità alla malattia è legata al genotipo

ARQ/VRQ. Infatti in questa razza Valina le pecore affette da scrapie con feti

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 56

suscettibili alla malattia (ARQ/VRQ e VRQ/VRQ) presentavano accumuli placentari di PrP^{Sc}, mentre nei soggetti con prole ARR/ARQ e ARR/VRQ non veniva rilevato alcun accumulo a carico della placenta. Nell'ambito di un lavoro volto a dimostrare la distribuzione della PrP^{Sc} in soggetti naturalmente e sperimentalmente infetti nella fase preclinica e clinica della malattia, Ersdal et al. (2005) mettono in evidenza la presenza di accumuli di PrP^{Sc} nella placenta di un soggetto di razza Rygja con genotipo VRQ/VRQ infettato sperimentalmente e con feto VRQ/ARQ.

Il meccanismo per cui si ha l'assenza di deposizione placentare in presenza di feti con genotipo resistente rappresenta sicuramente un argomento intrigante. Secondo una teoria la PrP espressa dal trofoblasto di feti ARQ/ARR potrebbe interagire con la PrP^{Sc} uterina attraverso lo stretto contatto che si verifica a livello della placenta tra i due tipi cellulari inibendo il processo di conversione.

Dal punto di vista pratico tali risultati suggeriscono che la trasmissione della malattia potrebbe essere ridotta o eliminata se le pecore sensibili alla scrapie presenti all'interno di un allevamento fossero accoppiate solo con maschi resistenti.

Questo perché verrebbe a mancare la contaminazione ambientale nel momento peripartale, che è stato riconosciuto come la fase più a rischio per la trasmissione orizzontale della scrapie.

Considerato che nella razza Romanov è stato osservato come anche soggetti con genotipo ARR/VRQ possono ammalarsi di scrapie. Lacroux et al., (2007) esaminò le placente di alcuni soggetti ARR/VRQ affetti da scrapie, con il risultato che nessuna placenta VRQ/VRQ accumulava PrP^{Sc}. E' probabile che in questi soggetti, in cui spesso anche il sistema linfatico appare negativo (Van Keulen et al, 1996; Andreoletti et al 2002), si abbia un inefficiente trasporto e diffusione della PrP^{Sc}

nell'organismo, col mancato coinvolgimento sia del sistema linfatico che della placenta.

Ruolo dello stato pre-clinico e clinico della madre. Per quanto riguarda il ruolo dello stadio della malattia nella diffusione di PrP^{Sc} a livello placentare, Tuo et al. (2002) esaminarono i placentomi di 11 pecore Suffolk ARQ/ARQ di 2 -5 anni d'età, con feti ARQ/ARQ. Tra queste, sei manifestavano sintomatologia clinica, mentre cinque erano asintomatiche, tutti i soggetti presentavano positività sia del SNC che del SLR. Degli 11 soggetti esaminati 10 presentavano PrP^{Sc} nei placentomi, mentre il rimanente, con scrapie clinicamente manifesta risultava negativo. Gli autori conclusero che il soggetto negativo fosse ancora ad uno stadio di gravidanza troppo precoce e che non vi era alcuna correlazione tra la positività dei placentomi e l'età degli animali o la fase della malattia. Tuttavia, in questo lavoro, poiché non ci sono dati immunostochimici sulla deposizione di PrP^{Sc} a livello encefalico, non viene definito esattamente lo stadio della malattia. Di conseguenza la quasi totalità della positività delle placente nei preclinici potrebbe anche essere spiegata dal fatto che le pecore erano sì precliniche, ma nella fase tardiva, immediatamente prima della manifestazione clinica. Nel nostro lavoro, prendendo in considerazione esclusivamente le gravidanze con feti che avevano il genotipo ARQ/ARQ_{wildtype} abbiamo osservato la mancanza di positività placentare in un capo a 140 giorni di gravidanza (# 124E047, tabella 5) mentre i capi sintomatici già a 90-100 giorni mostravano PrP^{Sc} nella placenta (Tabella 7). Questo dato, se pur ottenuto esaminando un numero basso di animali, potrebbe fare sospettare che nella fase clinica della malattia a parità di periodo di gestazione la percentuale di placente positive, nei capi ARQ/ARQ sia più alta.

Andreoletti et al. (2002) esaminò le placente di 9 pecore Romanov ARQ/VRQ in fase asintomatica con feti sensibili definendo lo stato di malattia mediante immunoistochimica della biopsia tonsillare. Egli riscontra la positività placentare in tutti i casi di positività tonsillare (ossia tutti i capi affetti da scrapie), affermando l'importanza del ruolo della placenta quale contaminante ambientale negli animali con malattia in fase di incubazione. Anche in questo caso non si hanno informazioni sul pattern di deposizione encefalica della PrP^{Sc}, e quindi sul reale stadio di avanzamento della patologia.

Il più alto numero di placente positive riscontrato da questi autori, rispetto a quanto osservato nel nostro studio, potrebbe essere legato al fatto che gli animali da essi esaminati pur essendo asintomatici, potevano essere ad uno stadio più avanzato della malattia. Non possiamo, inoltre, escludere *a priori* che fattori correlati alla razza o al ceppo dell'agente di scrapie implicato nell'infezione possano avere un ruolo.

Ruolo dello stadio di gravidanza. Lacroux et al. (2007) descrivono un notevole incremento di PrP^{Sc} nei placentomi nel corso della gravidanza in soggetti con genotipo VRQ/VRQ. Infatti a due mesi di gestazione solo pochi capi mostravano già una deposizione di proteina patologica a carico del placentoma, rilevata mediante Elisa, IHC e PET blot e caratterizzata da foci di deposizione granulare sparsi a vari livelli del placentoma.

Nello stesso studio, a partire da tre mesi di gravidanza tutti i placentomi analizzati erano positivi, con un livello di PrP^{Sc} in crescita esponenziale. A quattro e cinque mesi le placche di PrP^{Sc} tendevano a diventare coalescenti, con un interessamento del 50-60% della superficie placentomale.

Ancora più precocemente sono state rilevate positività ARQ/ARQ di razza Suffolk da Tuo et al. (2002), che identificano la presenza di proteina prionica patologica in soggetti a partire da soli 40 giorni post accoppiamento. Diversamente nel nostro lavoro in un soggetto ARQ/ARQ_{wildtype} asintomatico a circa 60 giorni di gravidanza non è stato rilevato nessun accumulo di PrP^{Sc} a livello dell'interfaccia materno fetale, mentre le prime positività placentari sono state osservate in capi ARQ/ARQ_{wildtype} asintomatici e sintomatici non prima di 90 – 100 giorni di gestazione. Paragonando questo risultato con quanto riscontrato dagli altri autori in altre razze e genotipi, nella razza Sarda la deposizione di PrP^{Sc} nella placenta non segue un aumento esponenziale con il progredire della gravidanza.

Localizzazione cellulare della PrP^{Sc} nel placentoma. In questo lavoro per definire la localizzazione dei depositi di PrP^{Sc} è stata eseguita una doppia immunoistochimica con un anticorpo specifico (F99) per la PrP^{Sc}, con un anticorpo anti-citocheratina di tipo II, in grado di evidenziare in maniera abbastanza specifica le cellule mononucleate del trofoblasto. Nei campioni esaminati, la colorazione per la PrP^{Sc} è associata sia alle cellule epiteliali endometriali, che alle cellule mononucleate e multinucleate del trofoblasto, mentre non sono mai interessate dalla deposizione di PrP^{Sc} le cellule trofoblastiche binucleate. Queste ultime cellule rappresentano una peculiarità della placenta dei ruminanti. Esse costituiscono il 15 – 20% della popolazione trofoblastica totale (Wooding et al., 1997), e la loro caratteristica principale consiste nella continua migrazione dall'epitelio trofoblastico a quello materno, a livello del quale si fondono con le cellule caruncolari per costituire ibridi feto-materni trinucleati (Wooding et al., 1992; Wango et al., 1990). La continua

migrazione delle cellule binucleate e la loro fusione in ibridi trinucleati, porta alla formazione di placche sinciziali ibride materno-fetali di limitata estensione.

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto rilevato da Tuo et al. (2002), i quali descrivono chiaramente la positività a carico dei tre tipi cellulari (trofoblasti mononucleati, trofoblasti multinucleati e cellule materne endometriali) in pecore di razza Suffolk con genotipo ARQ/ARQ. Essi riportano un interessamento della porzione endometriale materna e del trofoblasto nel corso dell'intera gravidanza, ma osservano un graduale spostamento della positività dalla porzione materna a quella fetale con l'avanzare della gestazione, con abbondante deposizione di PrP^{Sc} nei trofoblasti intorno all'ematofago placentare nel periodo del parto. Anche Ersdal (2005), in pecore VRQ/ARQ, osserva la positività per la PrP^{Sc} sia in cellule endometriali che in cellule trofoblastiche. Egli descrive la positività nel trofoblasto come pochi granuli di notevoli dimensioni, mentre identifica gli accumuli endometriali come piccoli e numerosi granuli diffusi a numerose cellule.

In forte contrasto Andreoletti (2002) nella razza Romanov, con genotipo VRQ/VRQ, afferma che la positività alla PrP^{Sc} è assolutamente limitata alla porzione cotiledonare del placentoma, ed interessa unicamente le cellule mononucleate e multinucleate, identificate mediante doppia IHC con un anticorpo monoclonale anti-PrP ed un siero di coniglio anti- citocheratina. Inoltre nello stesso lavoro utilizzando anticorpi anti-CD68, specifici per i macrofagi, vennero identificati rare cellule CD68+ con depositi intracitoplasmatici di PrP^{Sc}.

Lacroux (2007) afferma che l'elemento cellulare in cui inizia a depositarsi la PrP^{Sc} è rappresentato dai trofoblasti multinucleati, nei quali rileva anche una iper-espressione della PrP^C. Solo secondariamente si avrebbe, sempre secondo questo

autore un accumulo di PrP^{Sc}, per contaminazione, nelle cellule trofoblastiche

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placentate di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 61

mononucleate. Anche questo dato, in conclusione, contrasta con quanto osservato in questo lavoro dove viene osservata una contemporanea presenza di PrP^{Sc} nelle cellule trofoblastiche e multinucleate anche nelle fasi iniziali di gravidanza.

Come rilevato in questo studio è stata già descritta (Tuo et al. 2002) mediante immunistochemica, una dinamica della positività per PrP^{Sc} con progredire della gravidanza dalla base verso l'apice del placentoma. Tuttavia nei nostri casi l'entità della deposizione rilevata non è omogenea, e non va aumentando nel corso della gravidanza, come osservato da altri autori (Tuo et al. 2002; Andreoletti et al. 2002, Lacroux et al. 2007). Infatti la placenta in cui è stata rilevata la maggior quantità di PrP^{Sc} era di una pecora asintomatica sacrificata a circa 100 giorni di gravidanza. Questo soggetto presentava una deposizione di PrP^{Sc} maggiore rispetto ad altri animali esaminati nella stessa fase gestazionale o in fasi più tardive.

L'esatta localizzazione e dinamica della deposizione placentare di PrP^{Sc} necessita di ulteriori indagini, in particolare resta da vedere quanto queste differenze riscontrate comparando i vari studi possano essere dipendenti dalla razza, ceppo dell'agente infettante o genotipo. Riguardo quest'ultima possibilità è da sottolineare il fatto che i lavori di Andreoletti et al. (2002) e di Lacroux et al. (2007) sono stati eseguiti in pecore VRQ/VRQ mentre nel nostro studio ed in quello di Tuo et. al. (2002) sono stati utilizzati soggetti ARQ/ARQ.

Riteniamo degno di importanza pratica la possibilità di evidenziare la PrP^{Sc}, sia mediante WB che IHC, nelle placente dei soggetti infettati sperimentalmente nonostante nell'organo vi fossero evidenti fenomeni di degenerazione autolitica. Questo potrebbe rendere possibile fare degli screening nei greggi durante il periodo dei parti al fine di rilevare quelli infetti dalla scrapie.

Assenza di depositi di PrP^{Sc} nell'utero di soggetti non gravidi. In questo studio sia mediante WB che IHC non è stata rilevato PrP^{Sc} nella parete uterina sia in pecore vuote che in quelle gravide (parete uterina inter-carruncolare). Questo risultato è in accordo con quanto osservato da Tuo e coll. (2002) che hanno esaminato gli uteri non gravidi di 15 pecore di razza Suffolk, di cui 11 sintomatiche e 3 asintomatiche. Tutti i soggetti sono risultati positivi all'esame del sistema nervoso e linfatico, mentre in nessun caso è stata rivelata la positività a carico dell'utero.

Ruolo dei polimorfismi ai codoni 141 e 176. I risultati del sequenziamento del gene del PRNP ci permettono di affermare che la presenza della mutazione F141L e N176K nei feti ARQ/ARQ non permette la deposizione di PrP^{Sc} nella placenta, sia nelle pecore asintomatiche naturalmente infette (3 mutate al codone 176 e 1 al 141) che in quelle sperimentalmente infette (3 mutate al codone 176 e 1 al 141).

Questo dato è ulteriormente confermato da quanto osservato in una pecora asintomatica con gravidanza gemellare di circa 100 giorni (tabella 5). In questo caso i placentomi afferenti al feto con genotipo ARQ/ARQ_{wildtype} contenevano abbondanti depositi di PrP^{Sc}, mentre in quelli afferenti al feto con la sostituzione aminoacidica al codone 141 non è stato rilevato alcun accumulo di proteina prionica patologica né con il WB né con l'IHC. La totale negatività dei placentomi del feto AF₁₄₁RQ/AL₁₄₁RQ non trova spiegazione se non nell'interferenza svolta dalla mutazione F141L di quest'ultimo sulla deposizione della PrP^{Sc} nella parte di pertinenza del feto mutato. D'altra parte è stato dimostrato da Alverson (2005) che la co-presenza in utero di un feto sensibile ed uno resistente non compromette la deposizione di PrP^{Sc} nei placentomi dell'individuo suscettibile alla malattia, né

determina l'accumulo nel soggetto resistente quando questi si trovano in corni uterini

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 63

distinti, mentre talvolta la co-localizzazione in un unico corno di feti suscettibili e resistenti, può determinare la deposizione placentomale di PrP^{Sc} anche nei soggetti con genotipo resistente.

Per quanto è a nostra conoscenza questa è la prima volta che viene segnalato l'effetto protettivo di questi polimorfismi paragonabile a quanto succede con la presenza dell'allele ARR. Tuttavia l'importanza sia del polimorfismo al codone 141 che a quello 176 nel modulare la resistenza/suscettibilità alla scrapie sia in animali infettati sperimentalmente che naturalmente infetti è stata osservata in recenti studi (Vaccari et al, 2007, Ligios et al. 2008).

CONCLUSIONI

L'unità strutturale del placentoma ovino può essere definito una "chimera" naturale, caratterizzata dalla intima interdigitazione tra i setti endometriali materni con genotipo materno e i villi del corionallantoide con genotipo fetale. Il meccanismo che governa lo spostamento della PrP^{Sc} attraverso il placentoma dalla base verso il piatto corionico, e che sembra rappresentare un processo temporale che conduce alla trasmissione materno-placentare, non è tuttora noto. Il riscontro, nelle fasi precoci della gravidanza, di positività per la PrP^{Sc} nel placentoma solo laddove si ha l'interdigitazione endometrio-corion-allantoide e la totale assenza nelle zone di solo endometrio suggeriscono l'importanza del tessuto placentare nel determinismo della deposizione di PrP^{Sc} nell'utero.

L'indagine svolta sulla dinamica e sulla localizzazione della PrP^{Sc} a carico delle placentate degli ovini di razza sarda ARQ/ARQ affetti da scrapie naturale e sperimentale conferma, anche in questa razza, l'importanza della contaminazione ambientale da parte delle placentate. Tuttavia tale ruolo sembra essere inferiore a quanto descritto nelle pecore VRQ/VRQ.

La localizzazione della PrP^{Sc} nelle placentate appare localizzata sia nelle cellule endometriali materne che nelle cellule trofoblastiche multinucleate e mononucleate. Nel corso della gravidanza è stato descritto uno spostamento delle positività dalla base verso l'apice del placentoma. Ciò farebbe pensare ad un meccanismo temporale che potrebbe concludersi con un passaggio dell'infezione al feto. Ad oggi non esiste alcuna esaustiva considerazione sulla possibilità di una trasmissione della malattia in utero. Però la placentazione delle pecore consente un totale isolamento del feto dalla struttura corionica (trofoblasto), e ciò potrebbe spiegare l'assenza di contaminazione in utero.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placentate di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 65

La genetica, ancora una volta, si rivela fondamentale nella patogenesi della scrapie. Infatti alla luce di quanto osservato sembra che essa governi anche la deposizione di PrP^{Sc} a livello della placenta. I risultati ottenuti in questa ricerca sono importanti ai fini della selezione genetica, poiché l'esistenza di nuove mutazioni correlate alla resistenza, quali la N176K e la F141L potrebbe definire un nuovo parametro di scelta di arieti. Infatti anche arieti di genotipo ARQ/ARQ potrebbero essere scelti e utilizzati per la rimonta nel caso avessero ulteriori mutazioni ai codoni 141 e 176.

BIBLIOGRAFIA

Aguzzi A., Polymenidou M. Mammalian Prion Biology: One Century of Evolving Concepts. 2004. *Cell* 116: 313–327.

Aguzzi A., Heikenwalder M. Pathogenesis of prion disease: current status and future outlook. 2006. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 765-775.

Andreoletti O, Lacroux C., Chabert A., Monnereau L., Tabouret G., Lantier F., Berthon P., Eychenne F., Lafond-Benestad S., Elsen JM., Schelcher F. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe to lamb transmission. 2002. *J Gen Virol.* 83:2607-2616.

Andréoletti O., Simon S., Lacroux C., Morel N., Tabouret G., Chabert A., Lugan S., Corbière F., Ferré P, Foucras G, Laude H, Eychenne F, Grassi J, Schelcher F. PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating scrapie. 2004. *Nat. Med. Jun;10(6):591-3.*

Andréoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Grosclaude J., Van K.L., Schelcher F., Elsen J.-M. and Lantier F. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. 2000. *J Gen Virol.* 81, 3115-3126.

Baldwin MA., Cohen FE., Prusiner SB. Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations. . 1995. *J Biol Chem* 18:270(33):19197-200.

Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Wälchli M., Groth DF., McKinley MP., Prusiner SB., Weissmann C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. 1986 *Cell. Aug 1;46(3):417-28 .*

Baylis, M. & Goldmann, W. The Genetics of scrapie in sheep and Goats. 2004. *Curr Mol Med* 4: 385-396.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 67

Beekes, M. & McBride, P. A. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. 2000. *Neurosci. Lett.* 278, 181–184.

Benestad S., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M., Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. 2003. *Vet Rec.* 153, 202-208.

Boshier DP., Holloway, H., The sheep trophoblast and placental function: an ultrastructural study. 1977. *J. Anat.* 124, 287–298.

Burton, G.J., Samuel, C.A., Steven, D.H. Ultrastructural studies of the placenta of the ewe: phagocytosis of erythrocytes by the chorionic epithelium at the central depression of the cotyledon. 1976. *Quart. J. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 61, 275–286.

Brandner S. CNS pathogenesis of prion diseases. 2003. *Br Med Bull*; 66:131-9. *Review.*

Brown DR., Qin K., Herms JW., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser PE., Kruck T., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D., Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. 1997. *Nature.* Dec 18-25;390(6661):684-7.

Brown DR. Metallic prions, 2004. *Biochem Soc Simp*, 71 : 193-202.

Brown DR. Neurodegeneration and oxidative stress : prion disease results from loss of antioxidant defence. 2005. *Folia Neuropath.* 43 : 229-243.

Bruce M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock, C. J. Transmissions to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. 1997. *Nature* 389, 498–501.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

Büeler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner RA., Autenried P., Aguet M., Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 1993 Jul 2;73(7):1339-47.

Caplazi, P., O'Rourke, K., Wolf, C., Shaw, D. & Baszler, T. V. Biology of PrP^{Sc} accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. 2004. *J Vet Diagn Invest* 16, 489–496.

Carson D.D., Bagchi I., Dey S.K., Enders A.C., Fazleabas A.T. , Lessey B.A., Yoshinaga, K., Embryo implantation. 2000. *Dev. Biol.* 223, 217–237.

Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeld-Jakob disease. 2004 *Proc Nat Acad Sci U S A*. 101:3065–3070.

Casalone C, Corona C, Crescio MI, Martucci F, Mazza M, Ru G, Bozzetta E, Acutis PL, Caramelli M. Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie. 2005 *J Virol*. 79(9):5847-9.

Chacón MA., Barría MI., Lorca R., Huidobro-Toro JP., Inestrosa NC. A human prion protein peptide (PrP(59-91)) protects against copper neurotoxicity. 2003. *Mol Psychiatry*. 8(10):853-62, 835.

Collinge J., Sidle KC., Meads J., Ironside J. e Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. 1996. *Nature*. 383, 685–690.

Cordes H., Bergström AL, Ohm J, Laursen H, Heegaard PM. Characterisation of new monoclonal antibodies reacting with prions from both human and animal brain tissues. 2008 *Immunol Methods*. Sep 15;337(2):106-20.

Cravero G, Guarda F, Dotta U, Guglielmino R. 1977. *La Clinica Veterinaria* 100, 1-14.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 69

Creutzfeldt H.G. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. 1920. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatrie* 57: 1-18.

Cuille, J. & Chelle, P.L. Experimental transmission of trembling to the goat. 1939. *C R Seances Acad Sci* 208, 1058-1160

Davies, D.C. & Kimberlin, R.H. Selection of Swaledale sheep of reduced susceptibility to experimental scrapie. 1985. *Veterinary Record* 116, 211.

Dawson, M., Hoinville, L.J., Hosie, B.D. & Hunter, N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Information Group. 1998. *Vet Rec* 142: 623-625.

Deslys JP, Grassi J. *Pathol Biol (Paris)*. [Screening tests for animal TSE: present and future] 2005 May;53(4):221-8. Review.

Dickinson A.G., Stamp J.T., Renwick C.C. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. 1974. *J Comp Pathol*, 84: 19-25.

Dickinson A., Young G., Stamp J., Renwick C. Scrapie: Experiments involving maternal transmission in sheep. 1976. *United States Department of Agriculture (USDA) Report of Scrapie Seminar ARS 91-53: 244-8.*

Di Guardo G., Marcato P.S. (2002): Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili; In: Marcato PS "Patologia Sistemica Veterinaria", Bologna, Edagricole-Il Sole 24 Ore, 1302-1311.

Ersdal C., Ulvund M.J., Espens A., Benestad S.L., Sarradin P., Landsverk T. Mapping PrPSc propagation in experimental and natural Scrapie with different PrP genotypes. 2005. *Vet Pathol*, 42: 258-274.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrPSc) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 70

Flint, A.P. Interferon, the oxytocin receptor and maternal recognition of pregnancy in ruminants and non- ruminants: a comparative approach. 1995. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 313–318.

McKelvey WAC, Mylne MJA, Williams A, Hunter N, Hope J, Fraser H. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. 1992. *Veterinary Record*, 128, 548-549.

Foote WC., Clark GR., Maciulis A., Call JW., Hourrigan J., Evans RC., Marshall MR., de Camp M. Prevention of scrapie transmission in sheep using embryo transfer. 1993. *Am J Vet Res. Nov*; 54(11): 1863 – 8.

Foster JD., McKelvey WA., Mylne MJ., William A, Hunter N., Hope J., Fraser H. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. 1992. *Vet Rec. Apr 18*; 130 (16): 341-3.

Foster JD., McKelvey W, Fraser H, Chong A, Ross A, Parnham D, Goldmann W., Hunter N. Experimentally induced bovine spongiform encephalopathy did not transmit via goat embryos. 1999. *J. Gen. Virol.* 80: 517-24.

Foster JD., Goldmann W., McKenzie C, Smith A, Parnham DW, Hunter N. Maternal transmission studies of BSE in sheep. 2004 *J Gen. Virol. Oct*;85(Pt 10):3159-63.

Fraser H. The pathology of a natural and experimental scrapie. 1976. *Front Biol* 44, 267–305.

Gajdusek D.C., Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. 1957. *N. Engl. J. Med.* 257: 974-978.

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers MP. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. 1966. *Nature* 209:794-796.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrPSc) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

Gajdusek D.C., Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of kuru in the native population. 1957. *New Engl. J. Med.*;257:974-978.

Gerstmann, J., Straussler E., Scheinker I. Uber eine eigenartige hereditar-familiare Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. 1936. *Z Ges Neurol.Psychiatr.* 154: 736-762.

Giese A., Kretzschmar H.A. Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. 2001. *Curr Top Microbiol Immunol*, 253: 203-217.

Goldmann, W., Baylis, M., Chihota, C., Stevenson, E. & Hunter, N. Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications from breeding programmes. 2005. *J Appl Microbiol.* 98: 1294-1302.

González L, Horton R, Ramsay D, Toomik R, Leathers V, Tonelli Q, Dagleish MP, Jeffrey M, Terry L. Adaptation and evaluation of a rapid test for the diagnosis of sheep scrapie in samples of rectal mucosa. 2008. *J Vet Diagn Invest.* Mar;20(2):203-8.

Gray, C.A., Taylor, K.M., Ramsey, W.S., Hill, J.R., Bazer, F.W., Bartol, F.F., Spencer, T.E., Endometrial glands are required for pre-implantation conceptus elongation and survival. 2001.*Biol. Reprod.* 64, 1608– 1613.

Greenstein, J.S., Murray, R.W., Foley, R.C. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine pre-attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. 1958.*Anat. Rec.* 132, 321–341.

Greig JR. Scrapie in sheep. 1950. *J Comp Pathol.* 60, 263-266.

Griffith J.S. Self-replication and scrapie. 1967. *Nature*, 215: 1043- 1044.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrPSc) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

Groschup, M. H., Lacroux, C., Buschmann, A., Lühken, G., Mathey, J., Eiden, M., Lugan, S., Hoffmann, C., Espinosa, J. C., Baron, T., Torres, J. M., Erhardt, G. & Andreoletti O. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. 2007. *Emerg Infect Dis* 13:1201-7.

Guillomot M., Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. 1995. *J. Reprod. Fertil.* 49, 39–51.

Hadlow. Scrapie and kuru. 1959. *Lancet* . 2:289-90.

Heggebø C. Press McL., Gunnes G, Ulvund M.J., Tranulis M.A. and Landsverk T. Detection of PrP^{Sc} in Lymphoid Tissues of Lambs Experimentally Exposed to the Scrapie Agent. 2003. *J.Comp.Path. Vol.128*, 172-181.

Heikenwalder M., Zeller N., Seeger H., Prinz M., Klönk P.C., Schwarz P., Ruddle N.H., Weisemann C., Aguzzi A. Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. 2005. *Science*, 307: 1107-1110.

Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C., Gowland I., Collinge J., Doey L.J., Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. 1997. *Nature*, 389: 448-450.

Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H, Ironside JW e Collinge J. Molecular classification of sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. 2003. *Brain* 126, 1333–1346.

Hoinville L J. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. 1996. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 15(3), 857-852.

Horiuchi, M. & Caughey, B. Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. 1999. *Struct. Fold. Des.* 7, R231- R240.

Hourigan J., Klingsporn A., Clark WW., De Camp M . Epidemiology of scrapie in the United States. In Slow transmissible diseases of the nervous system, 1979. Vol. 1 (S.B. Prusiner e W. J.Hadlow, eds). Academic Press, New York. 331-356.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 73

Houston F., Foster JD., Chong A., Hunter N., Bostock CJ. Trasmission of BSE by blood trasfusion in sheep. 2000. *Lancet. Sep 16;356(9234):999-1000.*

Hunter, N., Goldmann, W., Smith, G. & Hope, J. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. 1994. *Arch Virol 137: 171-177.*

Hunter, N. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. 1997. *Trends Microbiol 5: 331-334.*

Hunter N., Foster J., Chong A., McCutcheon S., Parnham D., Eaton S., MacKenzie C., Houston F. Trasmission of prion disease by blood trasfusion. 2002. *J Gen Virol. Nov;83(Pt 11):2897-905.*

Hunter N., Foster, J. D. & Hope, J. Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms. 1992. *Vet Rec 130: 389-392.*

Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). 1921. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatrie 64: 147-228.*

Jeffrey M., Martin S., Gonzalez L., Ryder S.J., Bellworthy S.J. and R. Jackman. Differential Diagnosis of Infections with the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and Scrapie Agents in Sheep. 2001. *J. Comp. Path. Vol. 125, 271-284.*

Kativar R D. A preliminary report on the occurrence of scrapie in Indian sheep. 1962. *Ceylon Veterinary Journal, 10, 93-96.*

Iulini B., Perazzini AZ., Porcario C., Coona C., Florio CL., Langeveld JMP., Capucci L., Ligios C., Marconi P., Caramelli M., Casalone C. Atypical scrapie in Italy: immunohistochemical study with a panel of different antibodies. 2006.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 74

Prion2006- Strategies, advances and trend towards protection of society.Ott.3-6. Torino.

Konold T., Moore S.J., Bellworthy S., Simmons HA. Evidence of scrapie transmission via milk. 2008. *BMC Veterinary Research 4:14.*

Kovacs G.G., Voigtlander T., Gelpi E., Budka H.Rationale for diagnosing human prion disease. 2004. *World J Biol Psychiatry. 2004. 5:83-91.*

Kovacs G.G., Budka H. 2008. Prion disease: From protein to cell pathology. 2008. *Am. J. Pathol. 172, n.3, march.*

Ligos C., Sigurdson CJ., Santucci C., Carcassola G., Manco G., Basagni M., Maestrale C., Cancedda MG., Madau L., Aguzzi A. PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. 2005. *Nat. Med. 11:1137–1138.*

Ligos C., Cancedda MG., Madau L., Santucci C., Maestrale M., Agrimi U., Ru G., Di Guardo G. PrP^{Sc} deposition in nervous tissues with no apparent lymphoid tissue involvement is a frequent finding in ARQ/ARQ sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie”. 2006. *Arch Virol. 151: 2007–2020.*

Ligos C., Maestrale C., Attene S., Sechi S., Galistu A., Santucci C., Cancedda M.G., Saba M., Patta C., Bandino E., Demontis F., Uras P., Carta A. Mutations at codons 137, 141, 154 and 176 of the PRNP gene significantly decrease the susceptibility to scrapie in ARQ/ARQ sheep. 2007. *Atti del Congresso Internazionale Prion2007.*

Ligos C., Cancedda GM., Margalith I., Santucci C., Madau L., Maestrale C., Basagni M., Saba M., Heikenwalder M. Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. 2007. *PLoS ONE Sep 12;2(9):e859.*

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

Masters C.L., Richardson E.P. Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. 1978. *Brain*, 101: 333-344.

McGowan, J.P.. Scrapie in sheep. 1922. *Scottish J.Agric.* 5: 365-375.

McKinley, M. P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. 1983. *Cell* 35, 57-62.

Miller M.W., Williams E.S., McCarty C.W., Spraker T.R., Kreeger T.J., Larsen C.T., Thorne E.T. Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. 2000. *J. Wildl. Dis.* 36:676-90.

Monleón E., Monzón M., Hortells P., Bolea R., Acín C., Vargas F. and Badiola J.J. Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid test on central nervous and lymphoreticular systems. 2005. *Journal of Virological Methods*, 125 165-171.

Montrasio F., Frigg R., Glatzel M., Klein M.A., Mackay F., Aguzzi A. and Weissmann C., Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. 2000. *Science*. May 19; 288(5469):1257-9

Myagkaya, G., Schellens, J.P.. Final stages of erythrophagocytosis in the sheep placenta. 1981. *Cell Tissue Res.* 214, 501-518.

Nonno R., Esposito E., Vaccari G., Conte M., Marcon S., Di Bari M., Ligios C., Di Guardo G., Agrimi U., Molecular Analysis of Cases of Italian Sheep Scrapie and Comparison with Cases of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and Experimental BSE in Sheep. 2003. *J. Clin. Microbiol*, 41:4127-4133.

Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M.P., Kent S.B., Aebersold R., Barry R.A., Tempst P., Teplow D.B., Hood L.E., Prusiner S.B., Weissmann C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. 1985. *Cell* 40: 735-746.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 76

Onodera, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y. & Shinagawa, M. Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan. 1993. *Microbiol Immunol* 37, 311-31.

O'Rourke KI., Baszler TV., Besser TE., Miller JM., Cutlip RC., Wells GAH., Ryder SJ., Parish SM., Hamir AN., Cockett NE., Jenny A. and Knowles DP., Preclinical Diagnosis of Scrapie by Immunohistochemistry of Third Eyelid Lymphoid Tissue. 2000. *J Clin Microbiol, Sept.*, P.3254-3259.

O'Rourke KI., Duncan JV., Logan JR., Anderson AK., Norden DK., Williams ES., Combs BA., Stobart RH., Moss GE. and Sutton DL. Active Surveillance for scrapie by Third Eyelid Biopsy and Genetic Susceptibility Testing of Flocks of Sheep in Wyoming. 2002. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Spt.*, p. 966-971.

Palsson P A. Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology. In slow transmissible diseases of the nervous system. 1979. Vol. 1 (S.B. Prusiner & W. J Hadlow, eds)..Academic Press, New York, 257-366).

Parry HB. Scrapie: a trasmissibile and hereditary disease of sheep. 1960. *Nature*, 185, 441-443.

Pattison I.H., Millson G.C. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. 1961. *J. Comp. Pathol.* 71: 101-108.

Pattison IH., Hoare MN., Jebbett JN., Watson WA. Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. 1972. *Vet Rec.* Apr 22;90(17):465-8.

Pattison IH., Hoare M.N., Jebbett J.N., Watson W.A. Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. 1974. *Br Vet J.* Jul-Aug;130(4):lxv-lxvii.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

Pearson GR., Wyatt JM., Gruffydd-Jones TJ., Hope J., Chong A., Higgins RJ., Scott AC., Wells GA. Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. 1992. *Vet Rec. Oct 3;131(14):307-10.*

Prusiner S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. 1982. *Science 216: 136-144.*

Prusiner S.B. Molecular biology of prion diseases. 1999. *Science, 252: 1515-1522.*

Prusiner SB. Prions. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA. 1998. 95: 13363-13383.*

Prusiner S.B. An introduction to prion biology and diseases. 1999. *Prion biology and diseases (S.B. Prusiner ed.) pp. 1-66 Cold Spring Harbor, New York.*

Race, R., Raines, A., Raymond, G. J., Caughey, B. & Chesebro, B. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt–Jakob disease in humans. 2001. *J Virol 75, 10106–10112.*

Race, R., Jenny, A. & Sutton, D. Scrapie infectivity and protease K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. 1998. *J Infect Dis 178, 949–953.*

Razaie P., Lantos P.L. Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. 2001. *Brain Res Brain Res Rev, 35: 55-72.*

Roberts, R.M., Liu, L., Alexenko, A.P. New and atypical families of type 1 interferons in mammals: comparative functions, structures and evolutionary relationships. 1997. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 56, 287–325.*

Roberts, R.M., Ealy, A.D., Alexenko, A.P., Han, C.S., Ezashi, T., 1999. *Trophoblast interferons. Placenta 20, 259–264.*

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrPSc) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

Roucou X., Gains M., LeBlanc A.C. Neuroprotective function of prion protein. 2004. *Neurosci. Res.* 75: 153-161.

Sakudo A., Lee D.C., Yoshimura E., Nagasaka S., Nitta K., Saeki K., Matsumoto Y., Lehmann S., Itohara S., Sakaguchi S., Onodera T. Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions. 2004. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 850-855.

Santos, R.L., Barreto-Filho, J.B., Marques, A.P., Andrade, J.S., Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. 1996. *Theriogenology* 46, 1077–1083.

Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M. Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1999. *Acta Neuropathol (Berl)*. 98:437-443.

Schlafer, D.H., Fisher, P.J., Davies, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. 2000. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 145–160.

Schreuder BE., van Keulen LJ., Vromans ME., Langeveld JP. and Smits MA. Preclinical test for prion diseases. 1996. *Nature. Jun 13*; 381(6583):563.

Schreuder BE., van Keulen LJ., Vromans ME., Langeveld JP. and Smits MA. Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. 1998. *Vet Rec., May 23*; 142(21):564-8.

Shyng SL., Huber MT., Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. 1993. *J Biol. Chem.* 268, 15 922-928.

Sigurdarson S. Epidemiology of scrapie in Iceland and experience with control measures. 1991. In *Sub-acute spongiform encephalopathies* (R. Bradley, M. Savey & B. Marchant, eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 233-242.

Sisò S., Gonzalez L., Jeffrey M., Martin S., Chianini F. Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep. 2006. *Vet Rec* 159:327-8.

Sorenson J.R. Prion diseases: copper deficiency states associated with impaired nitrogen monoxide or carbon monoxide transduction and translocation. 2001. *J Inorg Biochem*, 87:125-127 32.

Sparkes R.S., Simon M., Cohn V.H., Fournier R.E., Lem J., Klisak I., Heinzmann C., Blatt C., Lucero M., Mohandas T. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. 1986. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 7358- 7562.

Stacey, T.E., Boyd, R.D., Ward, R.H., Weedon, A.P. Placental permeability in the sheep. 1977. *Ann. Rech. Vet.* 8, 345–352.

Tatzelt J., Schatzl HM. Molecular basis of cerebral neurodegeneration in prion disease. 2007. *FEBS J* 274 :606-611

Tessitore V. The nitroxidergic neuron in central and peripheral nervous system and related paraneural structures. 1998. *Ital J Anat Embriol*, 103: 13-52 4.

Thomzig A., Schulz-Schaeffer W., Wrede A., Wemheuer W., Brenig B., Kratzel C., Lemmer K., Beekes M. Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the *skin of animals with experimental and natural scrapie*. 2007. *PLoS Pathogens*, 3 (5):659-667.

Thuring CMA., Erkens JHF., Jacobs JG., Bossers A., Van Keulen LJM., Garssen GJ., Van Zijderveld FG., Ryder SJ., Groschup MH., Sweeney T. and Langeveld JPM. Discrimination between Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy in Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di obvini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 80

Sheep by Molecular Size, Immunoreactivity, and Glycoprofile of Prion Protein. 2004. *J Clin Microbiol, March, P.972-980, Vol. 42, No.3.*

Thuring CMA., VanKeulen LJM., Langeveld JPM., Vromans MEW., van Zijderveld FG. and Sweeney T. Immunoistochemical Distinction between Preclinical Bovine Spongiform Encefalopathy and Scrapie Infection in Sheep. 2005. *J.Comp.Path., Vol.132,59-69.*

Tuo, W., Zhuang, D., Knowles, D.P., Cheevers, W.P., Sy, M.S., O'Rourke, K.I. PrP^C and PrP^{Sc} at the fetal–maternal interface. 2001. *J. Biol. Chem. 276, 18229–182.*

Tuo, W., O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Cheevers, W. P., Spraker, T. R. & Knowles, D. P. Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A 99, 6310–6.*

Unterberger U., Voigtlander T., Budka H. pathogenesis of prion disease. 2005. *Acta Neuropathol. 109:32-48.*

Vaccari, G., Petraroli, R., Agrimi, U., Eleni C., Perfetti, M.G., Di Bari, M. A., Morelli, L., Ligios, C., Butani, L., Nonno, R., & Di Guardo, G. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. 2001. *Arch Virol 146: 2029-2037.*

Vaccari, G., D'Agostino,C., Nonno, R., Rosone, F., Conte, M., Di Bari, M. A., Chiappini, B., Esposito, E., De Grossi, L., Giordani, F., Marcon, S., Morelli, L., Borroni, R. & Agrimi, U. Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy. 2007. *J Virol 81: 7306–7309*

VanKeulen LJ., Schreuder BE., Meloen RH., Mooij-Harkes G., Vromans ME. and Langeveld JP. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. 1996. *Clin Microbiol. May; 34(5): 1228-31.*

VanKeulen L.J., Scheureuder B.E.C., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M., Smits M.A. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. 2000. *Arch. Virol. Suppl.* (16):57-71.

VanKeulen L.J., Vromans M.E., and van Zijderveld F.G. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. 2002. *APMIS. Jan*; 110(1):23-32.

VanKeulen L.J., Bossers A., van Zijderveld F. TSE pathogenesis in cattle and sheep. 2008. *Vet Res. Jul-Aug*;39(4):24. Review.

Vascellari M., Nonno R., Mutinelli F., Bigolaro M., Di Bari M.A., Melchiotti E., Marcon S., D'Agostino C., Vaccari G., Conte M., De Grossi L., Rosone F., Giordani F., Agrimi U., PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. 2007. *J. Virol.* 81:4872-4876.

Vassallo N., Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. 2003. *J Neurochem*, 86: 538-544.

Vey M., Pilkuhn S., Wille H., Nixon R., DeArmond S.J., Smart E.J., Anderson R.G., Taraboulos A. e Prusiner S.B. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. 1996. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 14945-14949.

Wadsworth J.D.F., Joiner S., Hill A.F., Campbell T.A., Desbruslais M., Luthert P.J. e Collinge J. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant CJD using a highly sensitive immuno-blotting assay. 2001. *Lancet* 358, 171-180.

Wango, E.O., Wooding, F.B.P., Heap, R.B. The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study. 1990. *J. Anat.* 171, 241-257.

Wells G.A., McGill I.S. Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. 1992. *Res Vet Sci.* 53:1-10. Review.

Wells G.A.H. and Wilesmith J.W. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. 1995. *Brain Pathology* 5, 91-103.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrPSc) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 82

Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C.M., Da Costa, M., Newman, S., Jenny, A.L., Detwiler, L., Prusiner, S.B. Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. 1994. *Genes and Development* 8, 959-969.

Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 19;99(6):3563-8. Epub 2002 Mar 12.

Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Cousens S.N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., Smith P.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. 1996 *The Lancet*, 347: 921-925.

Williams ES e Young S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. 1980. *J Wildl Dis*. 16:89-98.

Wimsatt, W.A. Observations of the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. 1951. *Am. J. Anat.* 89, 233–282.

Wooding, F.B.P., Wathes, D.C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. 1980. *J. Reprod. Fertil.* 59, 425–430.

Wooding, F.B.P.. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. 1992. *Placenta* 13, 101–113.

Wooding, F.B.P., Morgan, G., Brandon, M.R., Camous, S. Membrane dynamics during migration of placental cells through trophoctodermal tight junctions in sheep and goats. 1994. *Cell Tissue Res*. 276, 387–397.

Laura Madau. Dinamica e localizzazione della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ affette da scrapie naturale e sperimentale. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo. 83

Wooding, F.B.P., Flint, A.P.F. Placentation. 1994. In: *Lamming, G.E. (Ed.), Marshall's Physiology of Reproduction, vol. III, 4th ed. Chapman and Hall, London, pp. 230–466.*

Wrathall A.E. Risks of transmitting scrapie and bovine spongiform encephalopathy by semen and embryos; 1997. *Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)*, 16: 240-264.

Wrathall A.E., Brown K.F.D., Sayers A.R., Wells G.A.H., Simmons M.M., Farrelly S.S.J., Bellerby P., Squirrell J., Spencer Y.I., Wells M., Stack M. J., Bastiman B., Pullar D., Scatcherd J., Heasman L., Parker J., Hannam D.A.R., Helliwell D.W., Chree A., Fraser H., Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE), 2002. *Vet. Rec.* 150:365–378.

Young G B, Stamp J T, Renwick C C, Dickinson A G. Field observations of scrapie incidence. 1966. In *Report of scrapie seminar, Washington D.C., 27-30 January 1964. Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA)*, 199-206.

Zlotnik I, Stamp Jt. Scrapie disease of sheep. 1961. *World Neurol.* 2:895-907.

TABELLE

	Tot aziendale	Tot resistenti	Tot sensibili	Tot esaminati (genotipo)	Affette da scrapie	gravide / vuote
Gregge A	496	361 (72,78%)	135 (27,22%)	52 (ARQ/ARQ)	13	7/6
Gregge B	441	267 (60,54%)	174 (39,45%)	36(ARQ/ARQ)	7	3/4
Gregge C	396	281 (70,95%)	115 (29,04%)	46(ARQ/ARQ)	3	3/0
TOT	1333	909	424	134	23	13/10

Tab. 4: numero dei capi resistenti e sensibili, numero degli animali geneticamente sensibili alla scrapie esaminati al WB e numero di quelli risultati affetti subclinicamente da scrapie. Sono inoltre indicate il numero delle pecore gravide o vuote.

# capo	Genotipo madre	Fase preclinica iniziale/terminale	PrP ^{Sc} nel SNC	PrP ^{Sc} nel linfatico	PrP ^{Sc} nella placenta	PrP ^{Sc} nell' utero	Stadio gravidanza	Genotipo feto
B078	AL ₁₄₁ RQ/AF ₁₄₁ RQ	iniziale	+	-	-		60 gg	AL ₁₄₁ RQN ₁₇₆ /AF ₁₄₁ RQK ₁₇₆
35255	AL ₁₄₁ RQ/AF ₁₄₁ RQ	iniziale	-	+	-		60 gg	ARQ/ARQ _{wildtype}
L029	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+	-		70 gg	ARQ/ARR
257	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	-	+	-		90 gg	ARQ/ARR
3	ARQ/ARQ _{wildtype}	terminale	+	+	+		90 gg	ARQ/ARQ _{wildtype}
B150	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+	+*		100 gg	ARQ/ARQ _{wildtype}
					-*			AL ₁₄₁ RQ/AF ₁₄₁ RQ
B040	ARQ/ARQ _{wildtype}	terminale	+	+	-		100 gg	ARQN ₁₇₆ /ARQK ₁₇₆
A853	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+	-		120 gg	ARQN ₁₇₆ /ARQK ₁₇₆
A856	AL ₁₄₁ RQ/AF ₁₄₁ RQ	iniziale	-	+	-		120 gg	AL ₁₄₁ RQ/AF ₁₄₁ RQ
B013	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+	-		140 gg	ARQ/ARR
B022	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	-	-		140 gg	AL ₁₄₁ RQ/AF ₁₄₁ RQ
65	ARQ/ARQ _{wildtype}	terminale	+	+	+		140 gg	ARQ/ARQ _{wildtype}
124E047	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+	-		140 gg	ARQ/ARQ _{wildtype}
A395	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+		-		
A433	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	-	+		-		
A535	ARQ/ARQ _{wildtype}	terminale	+	+		-		
A537	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+		-		
A760	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	-	+		-		
A814	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+		-		
147	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+		-		
400	ARQ/ARQ _{wildtype}	terminale	+	+		-		
420	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+		-		
649	ARQ/ARQ _{wildtype}	iniziale	+	+		-		

Tab 5: risultati degli esami di WB e IHC sui 23 soggetti asintomatici prelevati in corso di abbattimento nei 3 greggi oggetto dello studio. Sono indicati anche il genotipo delle pecore e dei feti, la fase preclinica (iniziale/terminale) di ciascun soggetto e lo stadio di gravidanza* = gravidanza gemellare.

# capo	Pattern immunoistochimico dell'obex	Fase preclinica iniziale/terminale	Lesioni spongiformi
124E047	lieve deposizione perineuronale e granulare diffusa a carico esclusivamente del nucleo motore dorsale del vago.	Iniziale	Assenti
A853	lieve deposizione intra e perineuronale, granulare diffusa del nucleomotore dorsale del vago; sporadica deposizione gliare stellata.	Iniziale	Assenti
B150	lieve deposizione intra e perineuronale e granulare diffusa del nucleo motore dorsale del vago.	Iniziale	Assenti
B022	lieve deposizione perineuronale e granulare diffusa del nucleomotore dorsale del vago.	Iniziale	Assenti
B078	lieve deposizione perineuronale e granulare diffusa del nucleomotore dorsale del vago.	Iniziale	Assenti
3	importante deposizione intra e perineuronale, granulare diffusa a carico dei vari nuclei dell'obex, presenza di moderata deposizione gliare stellata e perivascolare.	terminale	Presenti
65	importante deposizione intra e perineuronale nei diversi nuclei dell'obex, deposizione gliare stellata e perivasale moderata.	terminale	Presenti
B040	abbondante deposizione intra e perineuronale a carico di tutti i nuclei dell'obex, notevole deposizione granulare diffusa, gliare stellata, perivascolare e sub ependimale.	terminale	Presenti
B013	lieve deposizione perineuronale e granulare diffusa del nucleomotore dorsale del vago.	Iniziale	Assenti
A856	pattern immunoistochimico negativo.	Iniziale	Assenti
257	lieve deposizione perineuronale e granulare diffusa a carico esclusivamente del nucleo motore dorsale del vago.	Iniziale	Assenti
L029	lieve deposizione perineuronale e granulare diffusa del nucleomotore dorsale del vago.	Iniziale	Assenti
35255	pattern immunoistochimico negativo.	Iniziale	Assenti

Tab 6: risultati della valutazione del pattern immunoistochimico a livello dell'obex dei 13 soggetti asintomatici gravidi prelevati in sede di abbattimento. E' indicata anche la fase preclinica (iniziale/terminale) e la presenza/assenza di lesioni spongiformi

# capo	Genotipo madre	Stadio malattia	PrP ^{Sc} nel SNC	PrP ^{Sc} nel linfatico	PrP ^{Sc} nella placenta	PrP ^{Sc} nell'utero	Stadio gravidanza	Genotipo feto
A418	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-*	-*	90 gg	ARQ/ARR
A278	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	+*	+*	90 gg	ARQ/ARQ _{wildtype} ARQ/ARQ _{wildtype}
211	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	+	-	100 gg	ARQ/ARQ _{wildtype}
0511	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	120 gg	ARQ/ARR
0355	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	120 gg	ARQ/ARR
147	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	120 gg	ARQ/ARR
B30	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	120 gg	ARQ/ARR
E811	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	140 gg	ARQ/ARR
0727	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	+	-	140 gg	ARQ/ARQ _{wildtype}
124D002	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	140 gg	ARQ/ARR
001	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	140 gg	ARQ/ARR
0036	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	140 gg	ARQ/ARR
GM1920	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
773	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
696	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
657	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
616	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
A469	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
B084	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
X26	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
X28	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
C076	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
C085	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
C071	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
C106	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
C086	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
1590	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
48L	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-
L70	ARQ/ARQ _{wildtype}	sintomatico	+	+	-	-	-	-

Tab 7: risultati degli esami di WB e IHC sui 29 soggetti sintomatici affetti da scrapie naturale. Sono indicati anche il genotipo delle pecore e dei feti e lo stadio della gravidanza * = gravidanza gemellare.

# capo	Genotipo madre	risultato WB	risultato IHC	Risultato placenta	Genotipo feto
18	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}
21	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}
25	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	-	ARQN ₁₇₆ /ARQK ₁₇₆
31	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}
54	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	-	AF ₁₄₁ RQ/AL ₁₄₁ RQ
42	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}
50	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}
45	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}
36	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	-	ARQN ₁₇₆ /ARQK ₁₇₆
003	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}
43	ARQ/ARQ _{wildtype}	+	+	+	ARQ/ARQ _{wildtype}

Tab.8: risultati degli esami di WB e IHC su 11 soggetti sintomatici infettati sperimentalmente. Sono indicati anche i genotipi delle pecore e dei feti.

IMMAGINI

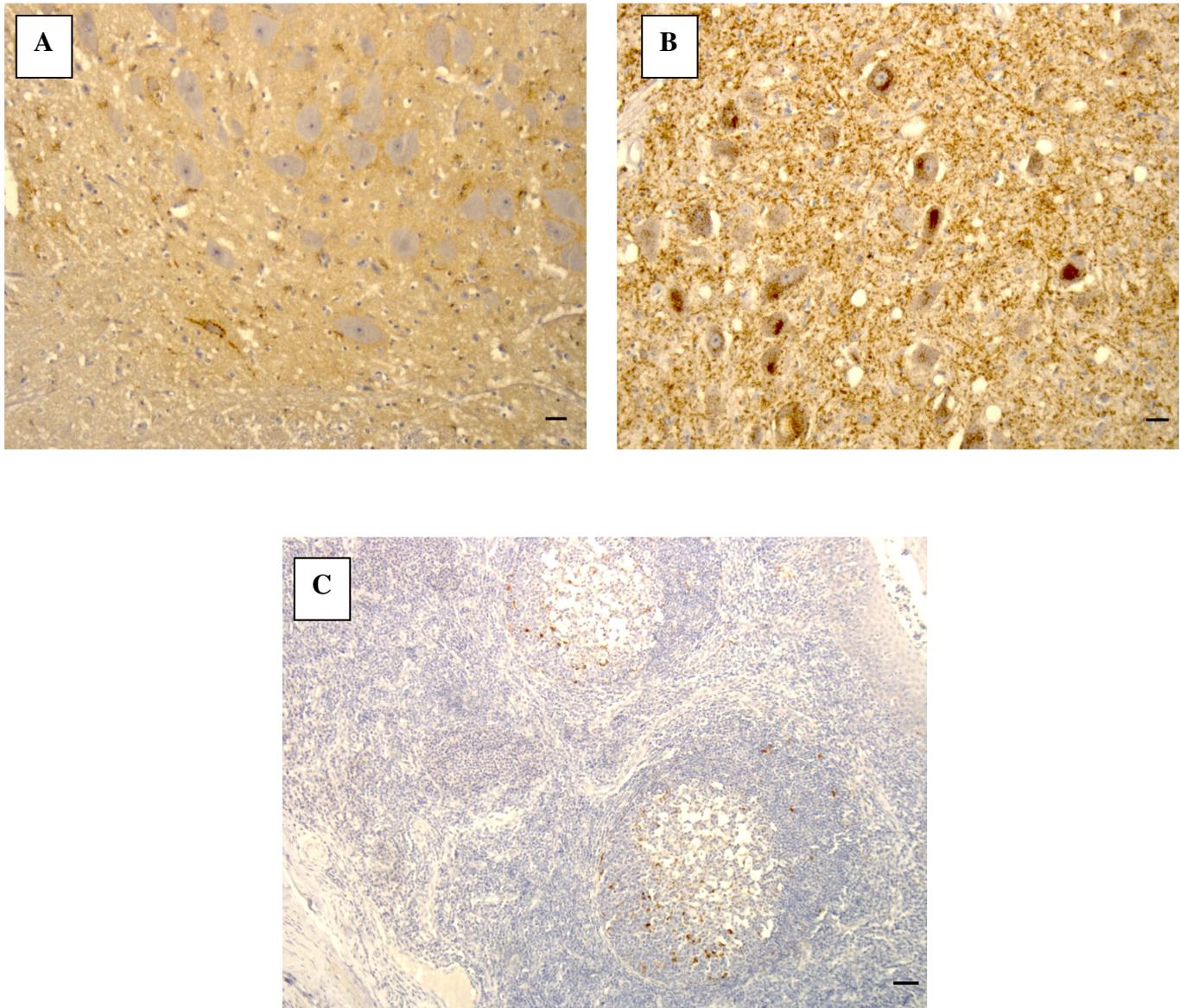


Foto 2: Pecore ARQ/ARQ_{wildtype} naturalmente infette da scrapie. Colorazione immunoistochimica per la evidenziazione della PrP^{Sc}. (A) Obex (nucleo dorsale del vago) di un soggetto preclinico nella fase iniziale, scarsa deposizione di PrP^{Sc} assenza di lesioni spongiformi 30 μ m; (B) Obex (nucleo dorsale del vago) di un soggetto preclinico, importante deposizione di PrP^{Sc} e presenza di lesioni spongiformi, Barra 30 μ m. (C) Linfonodo retrofaringeo di un soggetto preclinico in fase iniziale, presenza di PrP^{Sc} nei centri germinativi dei follicoli.. Anticorpo primario F99, rivelazione con DAB. Barra 70 μ m.

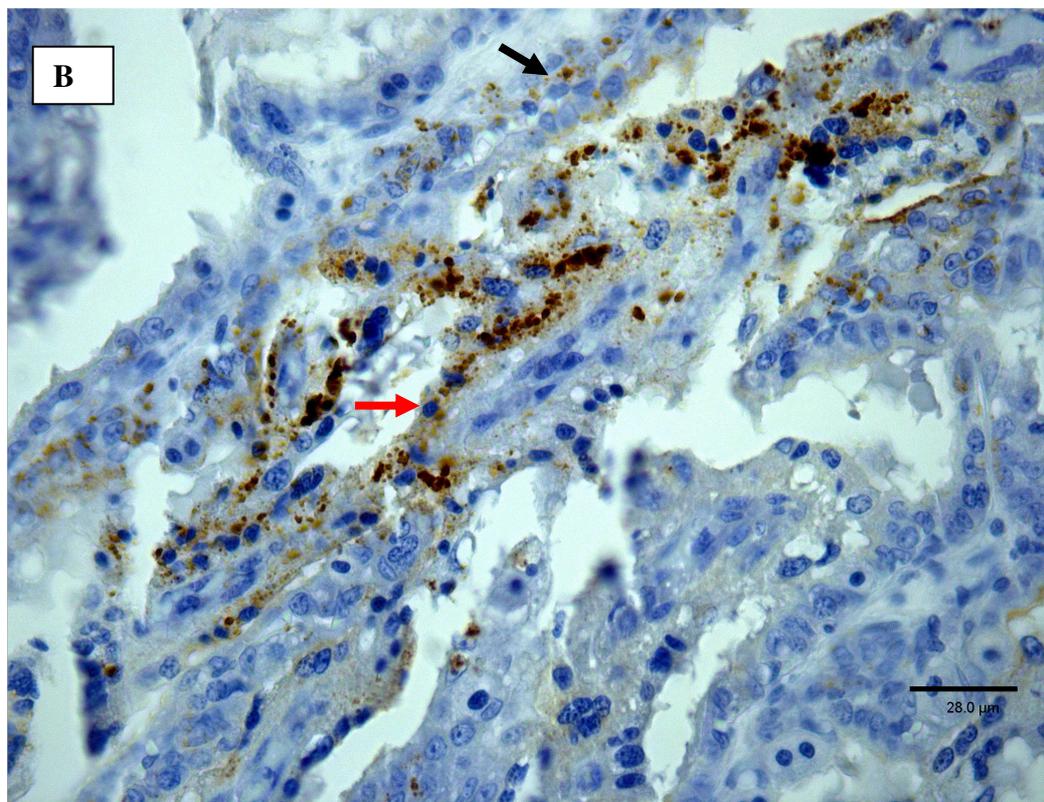
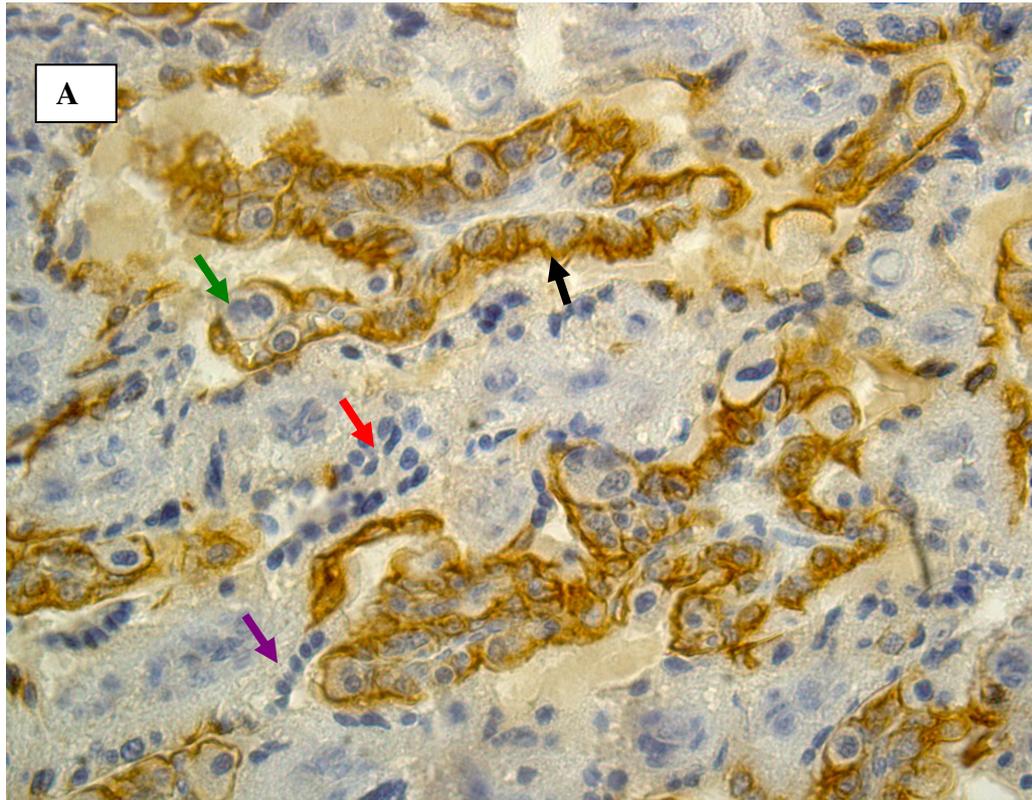


Foto 3: Pecora ARQ/ARQ_{wildtype} naturalmente infetta da scrapie, preclinica. Placentoma (A) Colorazione immunohistochemica per la evidenziazione della citocheratina tipo II, cellule trofoblastiche mononucleari positive (freccia nera), cellule trofoblastiche binucleate negative (freccia verde), cellule multinucleate sinciziali negative (freccia rossa), cellule endometriali materne negative (freccia viola). Rivelazione con DAB. (B) Colorazione immunohistochemica per la evidenziazione della PrP^{Sc}, interfaccia maerno-fetale, cellule

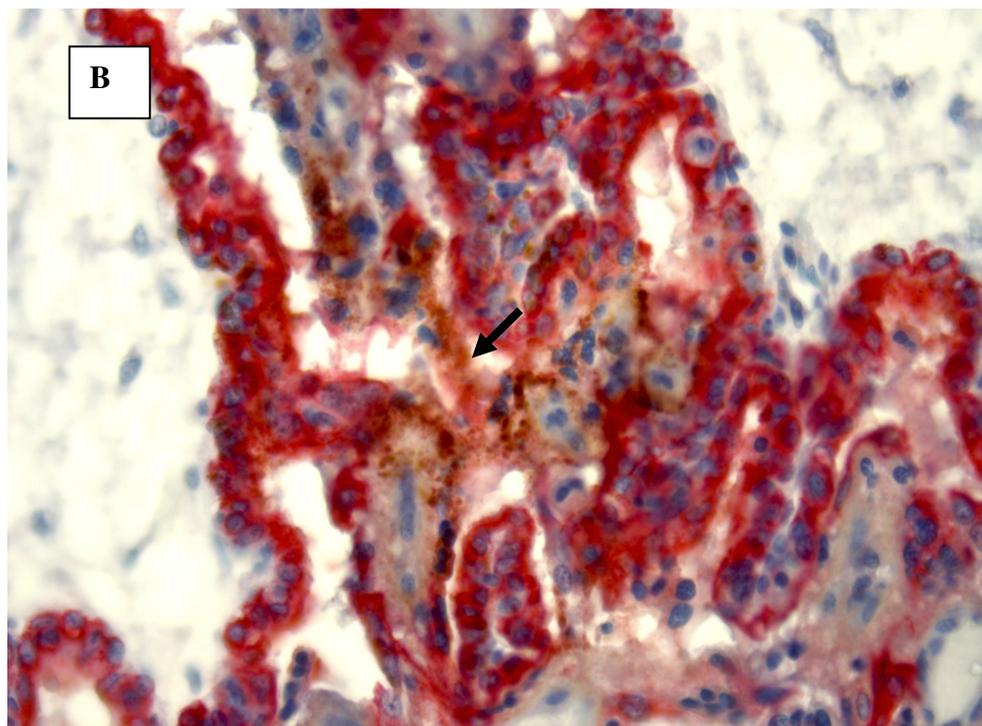
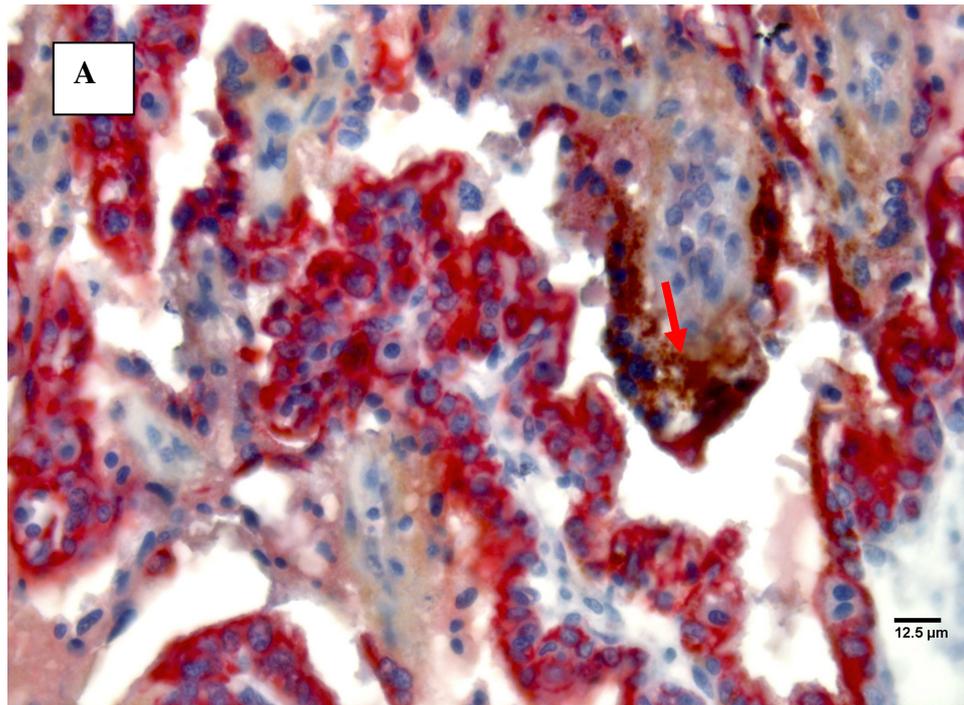


Foto 4: Pecora ARQ/ARQ_{wildtype} naturalmente infetta da scrapie, preclinica. Placentoma. (A) Doppia immunoistochimica per la evidenziazione della citocheratina tipo II (rosso) e della PrP^{Sc} (marron-scuro). La co-localizzazione (freccia rossa) non è presente nelle cellule trofoblastiche multinucleate (A) mentre lo è (freccia nera) in quelle mononucleate (B). Rilevazione con DAB e AEC.

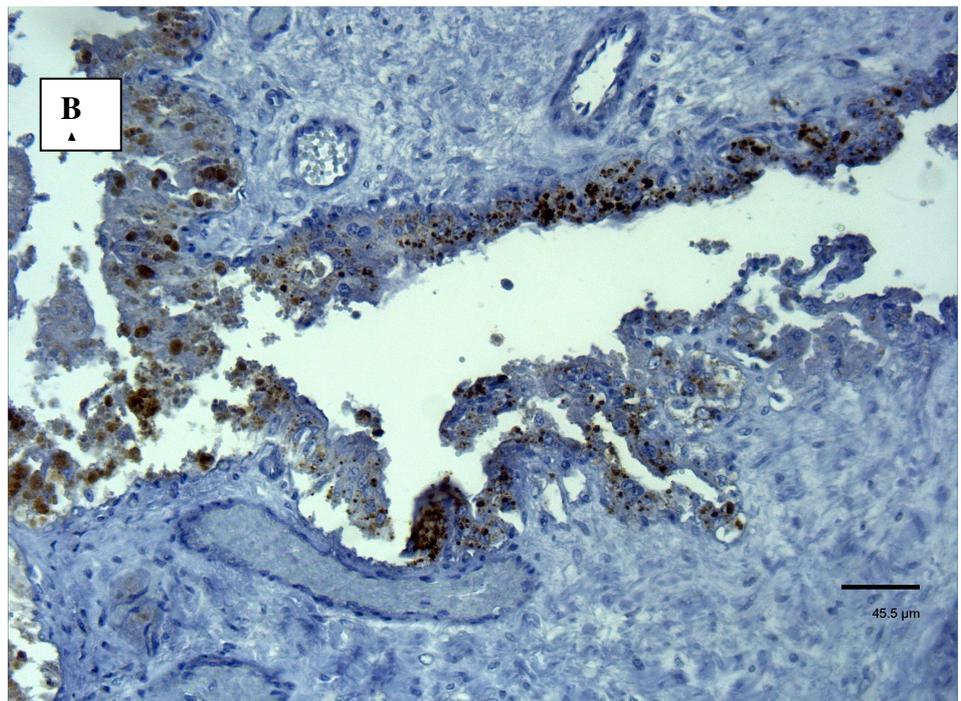
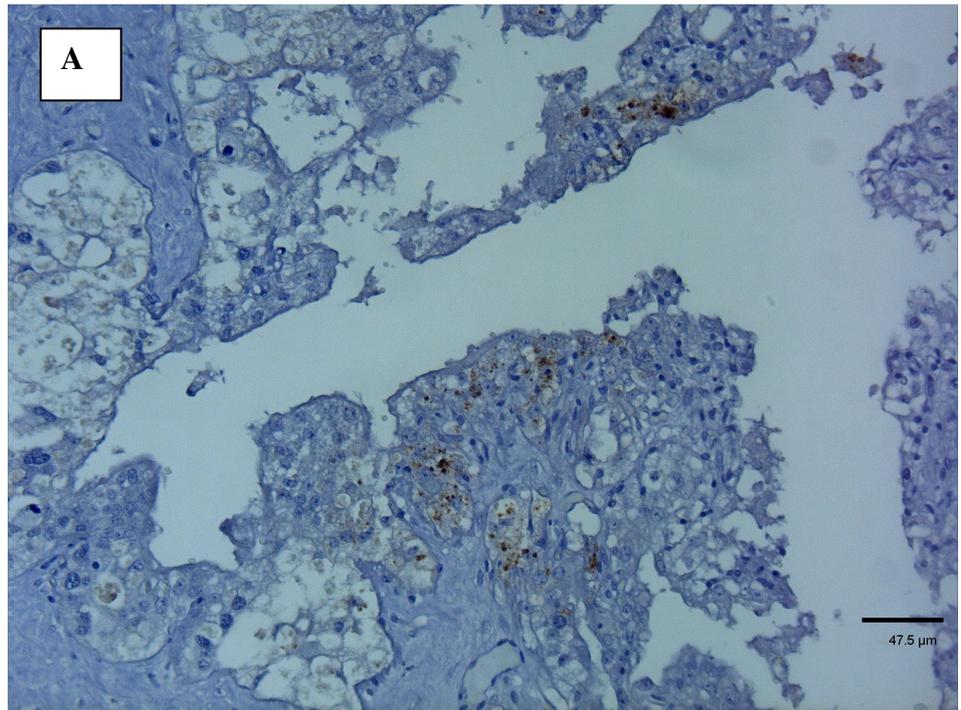


Foto 5: Pecora ARQ/ARQ infettata sperimentalmente con scrapie, placenta espulsa. Colorazione immunohistochimica per la evidenziazione della PrP^{Sc}. Deposizione granulare di PrP^{Sc} è osservata, in due diverse aree (A e B), a livello dell'epitelio trofoblastico. La presenza di evidenti fenomeni autolitici non permette una esatta localizzazione cellulare dei granuli. Anticorpo primario F99, rivelazione con DAB.

Laura M. (PrP^{Sc}) nelle placente di ovini di razza sarda ARQ/ARQ infette da scrapie naturale e sperimentalmente. Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale. XXI ciclo.

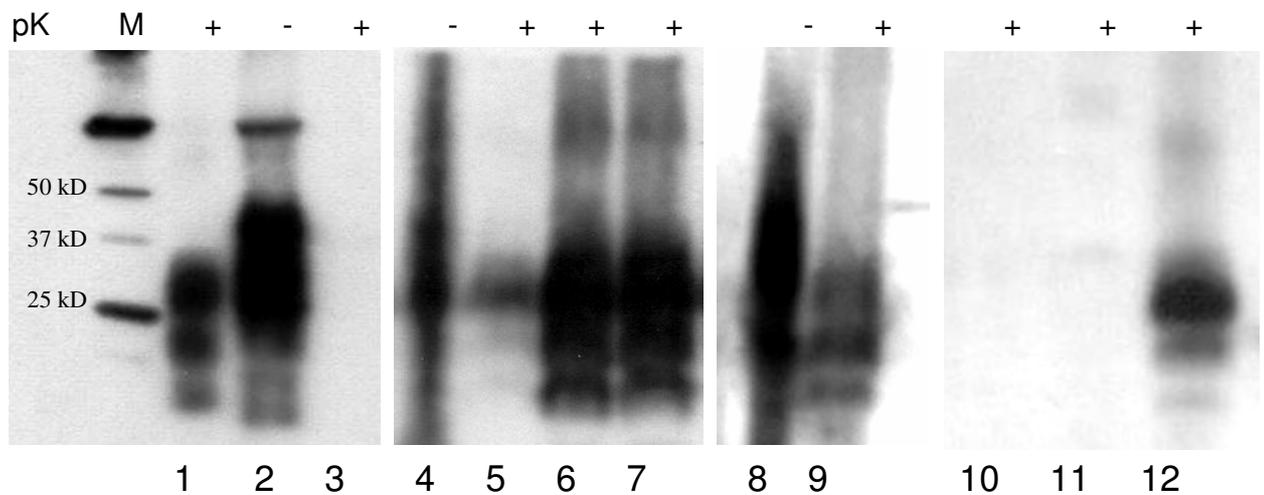


Figura 9: Pecore con scrapie sperimentale. Cervello e placente espulse. Evidenziazione della PrP^{Sc} mediante WB. Cervello (linea 1), cervello controllo negativo (linee 2 - 3), placente (linea 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9 - 12). Le placente 10 e 11 sono risultate negative e corrispondono a due agnelli con le mutazioni F141L e N176K al gene *PRNP*. Trattati (+) o non trattati (-) con proteinasi K (pK). M: marker molecolare

*Si ringraziano per il prezioso ed indispensabile aiuto le Dr.sse:
Giannella Cancedda, Franca Demontis, Cinzia Santucciu, Maria
Giovanna Tilocca, Caterina Maestrone, Sonia Attene, Adriana Galistu,
Silvia Crudeli ed infine il Signor Alfio Lai.*

*Un sentito riconoscimento alla Dr.ssa Cristiana Patta per il supporto
dato allo svolgimento di questa ricerca.*