



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Studio sul possibile ruolo del Fattore di Rilascio della Corticotropina (CRF)

come marker di sofferenza agonica nel cane.

Relatore

Ch.mo Prof. Massimo Castagnaro

Correlatori

Dott. Emanuele Ricci

Dott.ssa Ginevra Brocca

Laureanda

Angela Rebesco

Matricola n.

1104399

ANNO ACCADEMICO 2019 - 2020

A chi vive spinto dalla passione

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE.....	15
1.1 Patologia Veterinaria Forense.....	15
1.1.a La situazione italiana.....	15
1.1.a.1 <i>Legislazione italiana</i>	16
1.1.b Nel Regno Unito.....	17
1.1.b.1 <i>Legislazione Inglese</i>	18
1.2 Classificazione degli abusi.....	18
1.3 Le nuove frontiere della Patologia Forense.....	19
1.3.a Patologia Forense Molecolare.....	19
1.3.a.1 <i>Limiti</i>	19
1.3.b Il cane come modello per l'uomo.....	20
1.4 Marker di sofferenza agonica.....	20
1.5 Che cos'è lo stress?.....	22
1.5.a La "sinfonia" dello stress.....	22
1.5.b <i>Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene</i>	23
1.6 Attivazione dell'asse HPA e meccanismo d'azione.....	24

1.6.a Vasopressina e stress.....	25
1.6.b Tempi di risposta.....	26
1.6.c Asse HPA: feedback negativo.....	27
1.6.d Meccanismo di inibizione.....	27
1.6.e Stress cronico: risposta adattativa o maladattativa.....	28
1.6.f L'abituazione.....	29
1.6.g Recettori dei Glucocorticoidi.....	30
1.6.h Principali funzioni dei Glucocorticoidi.....	31
1.6.i Il Sistema Limbico: funzioni e modificazioni.....	31
1.6.l Influenza del sesso.....	33
1.6.m Influenza di età e sviluppo.....	34
1.7 Focus sul CRF.....	34
1.7.a Il Fattore di Rilascio della Corticotropina.....	34
1.7.a.1 <i>La scelta del CRF</i>	35
1.7.a.2 <i>La famiglia del CRF</i>	35
1.7.a.3 <i>Urocortina</i>	35
1.7.a.4 <i>Distribuzione del CRF</i>	36
1.7.a.5 <i>Tipi recettoriali: distribuzione e funzione</i>	37
2. SCOPO E STRUTTURAZIONE DELLO STUDIO.....	39

3. MATERIALI E METODI.....	41
3.1 Selezione dei casi.....	41
3.1.a Provenienza dei campioni.....	41
3.1.b Criteri di inclusione ed esclusione.....	42
3.2 Area di interesse.....	43
3.2.a Encefalo: macroanatomia.....	43
3.2.b Nucleo Paraventricolare dell'Ipotalamo.....	43
3.2.b.1 <i>Neuroni Parvocellulari</i>	44
3.3 Preparazione dei campioni.....	45
3.4 Indagine immunostochimica.....	45
3.4.a Principi base di funzionamento.....	45
3.4.b Metodo indiretto o con i coniugati.....	46
3.4.c Metodo indiretto con Avidina-Biotina.....	47
3.4.d Metodo di rivelazione con immunocomplessi.....	47
3.4.e Blocco delle reazioni e colorazioni aspecifiche.....	48
3.4.e.1 <i>Saturazione dei siti di legame non specifici (blocking)</i>	48
3.4.e.2 <i>Blocco degli enzimi endogeni</i>	49
3.4.e.3 <i>Blocco della Perossidasi Endogena</i>	49
3.4.e.4 <i>Blocco della Fosfatasi Alcalina Endogena</i>	49
3.4.f Amplificazione.....	50

3.4.g Controcolorazione.....	50
3.4.h Anticorpi.....	50
3.4.h.1 <i>Anticorpi monoclonali e policlonali</i>	51
3.4.h 1.1 <i>Vantaggi e limiti</i>	52
3.5 Applicazione dell'IHC allo studio.....	52
3.5.a Anticorpo usato.....	53
3.5.b Determinazione dell'omologia.....	53
3.5.c Prove di reattività e diluizioni.....	53
3.5.d Analisi immunoistochimica.....	54
3.5.e Sistema di rivelazione.....	54
3.5.f Procedura immunoistochimica.....	55
3.6 Acquisizione delle immagini.....	56
3.7 Analisi delle immagini.....	57
3.8 Analisi statistica.....	61
4. RISULTATI	65
4.1 Scelta dei campioni.....	65
4.2 Analisi statistica.....	69

4.2.a Risultati ottenuti con il test di Mann-Whitney.....	71
4.2.a.1 <i>Mann-Whitney applicato ai dati di Classificazione</i>	71
4.2.a.2 <i>Mann-Whitney applicato ai dati di Segmentazione</i>	72
4.2.b Analisi dei sottogruppi.....	73
4.2.c Analisi della curva ROC.....	74
5. DISCUSSIONE	77
5.1 Analisi dei sottogruppi.....	78
5.2 Limiti.....	79
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	81
7. ALLEGATI E PROTOCOLLI	85
7.1 Fascicolo fotografico necropsia legale Università Liverpool.....	85
7.2 Scheda dati anticorpo.....	93
7.3 Protocollo procedura Immunoistochimica.....	95
8. BIBLIOGRAFIA	101
9. RINGRAZIAMENTI	107

RIASSUNTO

La morte di un animale può essere un evento a rapido decorso o essere associata ad una lunga sofferenza: la determinazione dello stress mentale e fisico, nonché del generico stato di sofferenza della vittima animale, rappresentano per il Veterinario Patologo Forense un obiettivo importante.

Lo scopo di questo lavoro è quello di individuare un potenziale “*marker di sofferenza*” che sia utilizzabile nella routine diagnostica, attraverso l’analisi della relazione tra la concentrazione del fattore di rilascio della corticotropina (*corticotropin releasing factor, CRF*), detto anche *corticotroping releasing hormone (CRH)* o corticoliberina, nei nuclei paraventricolari ipotalamici (*paraventricular nuclei, PVN*) e lo stress agonico.

In Medicina Umana le risposte cellulari allo stress sono importanti indicatori del tempo di sopravvivenza dopo un crimine; il CRF in particolare è un elemento chiave nell’adattamento agli stress esogeni ed endogeni regolando le risposte endocrino-comportamentali a tali stimoli, e provocando il rilascio ipofisario di corticotropina, detta anche ormone adrenocorticotropo (ACTH), con conseguente secrezione surrenalica di glucocorticoidi (GCs) come il cortisolo.

Dal momento che il CRF esplica la sua azione nel corso di giorni/settimane, l’intento di questo studio è di indagarne il ruolo come potenziale *marker* atto a distinguere tra morte improvvisa e morte associata a sofferenza protratta.

Parole chiave: cane, CRF, CRH, PVN, stress agonico, sofferenza, marker.

ABSTRACT

Animal death may be a rapid process or associated with a long agonic period: the victim's mental and physical load determination, as well as the generic suffering, are for the Forensic Pathologist Veterinarian a very important aim.

The purpose of this study is to found a potential "marker of suffering" useful in the diagnostic routine, by analyzing the relationship between CRF concentration in the hypothalamic PVN and the agonic stress. In human medicine, cellular responses to stress are important indicators of survivor time after a crime; CRF, in particular, is a key element in exogenous and endogenous stressors adaptation: indeed this peptide can regulate endocrine-behavioral responses to stress stimulating pituitary ACTH release and consequent GCs adrenal secretion.

Since CRF acts in days/weeks, this study investigates its role as a potential distinctive marker between sudden death and death associated with a longer agonic period.

Key words: *dog, CRF, CRH, PVN, agonic stress, suffering, marker.*

1.INTRODUZIONE

1.1 Patologia Veterinaria Forense

“Il veterinario forense riveste un ruolo cruciale, un’investigazione accurata e un report ben eseguito che presentino i fatti alla corte nella presa di decisione, vanno a supporto dell’applicazione della legge assicurando la giustizia. Con le parole di Aristotele (384-322 a.C.): ‘ È nella giustizia che si fonda l’ordinamento della società’. (R. Munro, Edinburgh 2008) “

1.1.a La situazione italiana

In Medicina Veterinaria, così come in Medicina Umana, un ruolo sempre più rilevante è stato assunto dalla pratica della necropsia forense, insostituibile fonte d’informazioni in tutti i casi di uccisione illegale e morte non naturale degli animali; ma anche in caso di illeciti in animali sportivi, avvelenamenti, aggressioni inter- e intra-specifiche.

Nel corso di una necropsia forense il Medico Veterinario, incaricato dal pubblico ministero (PM), riveste il ruolo di consulente tecnico del PM stesso (CTPM) e concorre nell’esercizio della funzione giudiziaria (art.359 c.p.p.). Il CTPM ha il compito di eseguire degli accertamenti tecnici (come gli esami anatomo-patologici e istopatologici), di documentare (documentazione fotografica) ed evidenziare una serie di elementi atti a costituire un elaborato peritale finale.

Il referto così prodotto, scritto in modo chiaro e preciso, rappresenta l’atto finale del lavoro del patologo veterinario e contiene tutte le informazioni raccolte durante l’esame del cadavere, cosicché egli possa assistere il tribunale nel comprendere le cause e il significato delle lesioni e dei cambiamenti rilevati in sede necroscopica.

L’esame istologico dei vari tessuti ed organi deve essere sempre eseguito anche in presenza di materiale autolitico e ha il valore di confermare, valutare o rivedere i processi patogenetici che possono aver contribuito alla causa di morte (Antuofermo et al., 2018).

L’istopatologia forense inoltre fornisce evidenze aggiuntive rendendosi utile nello stabilire con maggiore precisione il tempo intercorso tra la morte e il ritrovamento, nonché lo stadio e l’evoluzione delle lesioni.

1.1.a.1 Legislazione italiana

Le principali normative in materia di maltrattamento ed eutanasia animale presenti in Italia sono le seguenti:

- La Legge del 20 luglio 2004 n. 189, recante disposizioni in materia di maltrattamento animale, prevede l'inserimento del titolo IX bis del Codice Penale (Gazzetta Ufficiale 2004). Essa è stata integrata dalla legge 201/2010 che ratifica e porta a esecuzione la Convenzione Europea per la protezione degli animali da compagnia (Gazzetta Ufficiale, 2010) e dal Decreto Legislativo 121/2011 che punisce l'uccisione, fuori dai casi consentiti, delle specie animali protette (Gazzetta Ufficiale, 2011).
- Titolo IX bis del libro II del Codice Penale: Dei delitti contro il sentimento per gli animali (Mosconi, 1974).

Tra le modifiche ricordiamo gli articoli:

- Art. 544-bis. – (Uccisione di animali). – Chiunque, per crudeltà senza necessità, cagiona la morte di un animale è punito con la reclusione da quattro mesi a due anni.
- Art. 544-ter. – (Maltrattamento di animali). – Chiunque, per crudeltà o senza necessità, cagiona una lesione a un animale ovvero lo sottopone a sevizie o a comportamenti o a fatiche o a lavori insopportabili per le sue caratteristiche etologiche è punito con la reclusione da tre mesi a diciotto mesi o con la multa da 5.000 a 30.000 euro.
- Legge del 14 agosto 1991 n.281: con la legge quadro in materia di animali di affezione e prevenzione del randagismo viene introdotto il divieto di soppressione per i cani vaganti (salvo se gravemente malati, incurabili o di comprovata pericolosità) e l'eutanasia viene definita atto esclusivamente medico veterinario. Nessuna precisazione viene invece fatta riguardo i cani di proprietà (Gazzetta Ufficiale, 1991).

Va precisato che in Italia il Codice Civile (C.C.) definisce l'animale come una cosa (*res*) di *proprietà* ed il proprietario può decidere se venderlo o se ucciderlo (*ius vitae ac necis*) (Codice Civile Libro Terzo, art.812).

In contrasto a ciò, gli articoli 727 e 544 bis C.P., considerano l'animale un essere sensibile degno di essere tutelato dalla legge in quanto in grado di percepire dolore e piacere.

L'uccisione di un animale è pertanto un crimine, mentre l'eutanasia, nonostante la necessità di regolamentare la materia in maniera più chiara, è legale in alcuni specifici casi, così come riportato dal Codice Deontologico Per Medici Veterinari: "Secondo l'art.34 l'eutanasia dell'animale è atto esclusivamente Medico Veterinario, rientra nell'etica professionale del Medico Veterinario e può essere effettuata al fine di evitare all'animale paziente sofferenza psico-fisica e/o dolore inaccettabili e nei casi consentiti dalla legge.

È responsabilità professionale del Medico Veterinario garantire, quando si deve interrompere la vita dell'animale, che ciò sia fatto con il maggior grado di rispetto possibile e con l'impegno a indurre la morte nella massima assenza di dolore e stress possibile" (FNOVI, 2019) (Passantino et al., 2006).

1.1.b Nel Regno Unito

In Inghilterra e Galles è presente la *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (RSPA), un ente di beneficenza che promuove il benessere degli animali con un ruolo attivo sia nello sviluppo della legislazione in materia sia nella sua applicazione.

Il corrispettivo italiano dell'RSPCA è l'Ente Nazionale Protezione Animali (ENPA).

E' interessante sottolineare come in Gran Bretagna , secondo la normativa sul benessere animale, sia irrilevante che l'abuso sia intenzionale o non intenzionale; la Corte di Giustizia nel giudicare un caso valuta ciò che "una persona ragionevole" avrebbe fatto in quella particolare circostanza (Munro, 2008).

1.1.b.1 Legislazione Inglese

Le principali normative in materia di maltrattamento ed eutanasia animale presenti nel Regno Unito sono le seguenti:

- *The Animal Welfare Act 2006*; secondo questo documento, l'uccisione di un animale è consentita solo tramite metodi che comportino la morte istantanea o un'immediata perdita di coscienza (*The animal welfare act, 2006*).
- *Code of Professional Conduct for Veterinary Surgeons*; nel codice di condotta professionale emergono due grandi differenze con l'Italia in merito all'eutanasia: al punto 8.2 del codice viene affermato come per legge l'eutanasia non sia un atto esclusivamente medico veterinario e come in diverse circostanze possa essere eseguita da chiunque sia in grado di praticarla umanamente. Nel punto 8.6 invece viene descritto lo scopo primario del Medico Veterinario, ossia quello di alleviare la sofferenza dell'animale, tuttavia tenendo conto non solo delle condizioni dell'animale, ma anche dei desideri del proprietario e delle circostanze. Rifiutare la richiesta del proprietario di praticare l'eutanasia infatti può comportare ulteriore stress per lui ed essere deleterio per il benessere dell'animale (*Royal College of Veterinary Surgeon, 2015*).

1.2 Classificazione degli abusi

Gli abusi inflitti agli animali possono essere di tipo fisico non accidentale, sessuale, emotivo, da trascuratezza; riguardo a questi ultimi, essi consistono nel non provvedere alle necessità basilari indispensabili alla sopravvivenza dell'animale, quali la messa a disposizione di cibo, acqua e riparo o la cura per la salute dell'animale.

Diagnosticare un abuso di tipo fisico non è semplice: il patologo veterinario ha a disposizione solo alcuni indicatori diagnostici come per esempio contraddizioni nell'anamnesi riportata dal proprietario, lesioni ripetute, tipo di ferita, etc.

Ad oggi dunque non si dispone di un univoco metodo di valutazione, soprattutto per quanto riguarda la determinazione oggettiva della sofferenza subita dall'animale (*Munro, 2008*).

1.3 Le nuove frontiere della Patologia Forense

1.3.a Patologia Forense Molecolare

Gli studi effettuati alla ricerca di *marker* che possano indicare e misurare il grado di sofferenza fisica e/o emotiva vissuto dalla vittima poco prima di morire sono numerosi.

Malgrado i progressi fatti, tuttavia, ulteriori indagini sono necessarie e ad oggi non esistono indicatori affidabili su cui basarsi.

La scienza che indaga tutto questo, in particolare le basi genetiche, le cause e i processi di morte a livello molecolare, è la Patologia Forense Molecolare, una branca della Patologia Forense, che è stata definita “*un’autopsia molecolare avanzata*” (Maeda, Ishikawa, Michiue, 2014).

Si tratta di procedure che possono essere svolte di pari passo con le investigazioni di routine sulla morte di un individuo, così da ricostruire le dinamiche del tempo di sopravvivenza, delle cause e dei processi di morte al fine di supportare e rinforzare i rilievi morfologici.

Lo scopo della Patologia Forense Molecolare è dunque l’individuazione di evidenze molecolari in grado di rappresentare i cambiamenti dinamici, funzionali e strutturali che spieghino il processo di morte in generale e nei casi specifici. Tali cambiamenti non possono essere rilevati attraverso la semplice osservazione morfologica ed è dunque necessario indagarli attraverso tecniche quali l’analisi del *background* genetico (genomica), la quantificazione dei trascritti di mRNA (trascrittomica), l’analisi delle proteine (proteomica), l’immunoistochimica e l’immunocitochimica (Maeda, Ishikawa, Michiue, 2014).

1.3.a 1 Limiti

Nell’indagare queste sfere, la Patologia Forense Molecolare deve però tener conto delle patologie preesistenti l’insulto, delle alterazioni dovute al processo di morte e dei cambiamenti *post mortem*. Trattandosi di procedure eseguite sulle carcasse, esse vengono necessariamente influenzate da interferenze non prevedibili, dipendenti da vari fattori *ante-* e *post mortem*; pertanto l’uso di una singola procedura può portare a diagnosi errate ed è quindi essenziale una visione d’insieme (Maeda, Ishikawa, Michiue, 2014).

1.3.b Il cane come modello per l'uomo

Anche per il Patologo Forense che opera in campo umano, è obiettivo importante avere a disposizione un *marker* che permetta di valutare lo stress agonico subito dalla vittima prima del crimine. Diversi progressi si stanno compiendo in questo senso nel settore medico umano così come in quello animale; quest'ultimo consente l'analisi di campioni molto più numerosi. I dati ottenuti dalla sperimentazione animale, dopo una adeguata conferma su materiale umano autoptico, possono poi essere validati in campo umano (Maeda, Ishikawa, Michiue, 2014).

1.4 Marker di sofferenza agonica

Numerosi studi si sono focalizzati sull'analisi di durata ed intensità del processo agonico dal punto di vista molecolare. Nel corso degli anni, diversi *marker* molecolari sono quindi stati validati e messi in relazione con determinate condizioni fisiopatologiche, permettendo un loro utilizzo nella pratica forense per la determinazione delle condizioni della vittima. Tra queste ricordiamo:

- la determinazione di ipoalbuminemia, rilevata in seguito a morte traumatica, può indicare una lunga agonia (così come nei soggetti malnutriti o in insufficienza epatica) *pre-mortem* (Maeda, Ishikawa, Michiue, 2014).
-
- l'eritropoietina sierica aumenta rapidamente in seguito ad un'emorragia massiva, mentre aumenta tardivamente in conseguenza di un'ipossia tissutale prolungata (Maeda, Ishikawa, Michiue, 2014).
-
- la neopterina sierica può essere usata come marker di risposta sistemica dopo una lesione o un'infezione virale (Maeda, Ishikawa, Michiue, 2014);
- vi è un rapporto tra la concentrazione di proteina C reattiva (CRP), una proteina di fase acuta prodotta nel fegato e rilevabile nel sangue, e le cause di morte e il tempo di sopravvivenza. La valutazione dei livelli ematici di CRP umana *post mortem* ha portato alla conclusione che l'elevata concentrazione di tale proteina possa essere considerata indicatore di morte naturale

(ad esempio un'infezione) o, in caso di trauma e dunque danno tissutale, indicatore di reazioni vitali (risposta infiammatoria) (Astrup & Thomsen, 2007);

- i livelli sierici di amilasi e gamma glutamil-transferasi (GGT) possono essere utilizzati come indici della severità del danno organico sistemico avvenuto durante il processo di morte, specialmente in seguito ad intossicazione.

Tuttavia, livelli superiori ad una certa soglia possono indicare patologie pancreatiche o epatobiliari (Michiue et al., 2013);

- vi è un rapporto tra la concentrazione di albumina nel fluido cerebrospinale (CSF) e nel plasma umani e la durata del periodo agonico; nei periodi agonici che si sono protratti per lungo tempo, è stata riscontrata un'aumentata permeabilità della barriera ematica cerebrale.

Questo risultato è stato messo in relazione con l'ipossia/ipercapnia che caratterizza il periodo agonico e si è concluso che la valutazione *post mortem* del tasso di albumina trasferita da plasma a liquor può essere un efficace indicatore della durata del periodo agonico (Mangina et al., 1983);

- le *heat shock proteins* (HSP) sono una famiglia di proteine sintetizzate dalle cellule in risposta a condizioni stressanti. Nel bovino, la cui carne presenta variazioni indesiderate nella tenerezza, stabilità dei sapori e nei colori, è stato dimostrato come lo stress *pre mortem* influisca sull'espressione delle HSP nel muscolo scheletrico dopo la macellazione (Reganne et al., 2019). Tra le HSP si annovera l'ubiquitina, una proteina di 76 aminoacidi ubiquitaria in tutti gli organismi viventi, tra le poche conservatesi inalterata nel corso dell'evoluzione. La sua funzione è marcare le proteine denaturate prodotte nella cellula durante lo stress così che vengano degradate, rimosse o riparate. L'ubiquitina è dunque essenziale nella risposta cellulare allo stress.

Ad oggi non è possibile quantificare scientificamente lo stress fisico e mentale, ma si può presumere che la rilevazione di ubiquitina nel locus coeruleus (LC) possa indicare entrambi i tipi di stress, date le connessioni neuronali presenti. Inoltre, l'immunoreattività all'ubiquitina nella substantia nigra può essere un indicatore di stress dovuto all'attività fisica prima della morte.

L'aumento dei neuroni positivi all'ubiquitina quindi potrebbe essere il risultato di un'iperattività dei neuroni noradrenergici nel LC durante la fase agonica che porta ad un'aumentata sintesi e redistribuzione della stessa. Studi preliminari indicano differenze significative nel numero di neuroni positivi all'ubiquitina nel LC in caso di morte avvenuta in seguito ad una lotta pronunciata ed intensa (Piette, Pieters, & De Letter, 2011);

- alcuni traumi possono lasciare traccia di sé nei livelli di espressione genica; di questo si sono occupati studi focalizzati sull'estrazione *post mortem* dell'mRNA umano o di topo, riscontrando una correlazione tra le modificazioni dell'espressione genica e le circostanze di morte (Tsuda, Nakasono, 2006) (Preece, 2003);
- le catecolamine sono tra i maggiori neurotrasmettitori implicati nella risposta a vari tipi di stress; tuttavia risultati contrastanti sulla loro utilità nell'indagine forense rendono necessari maggiori approfondimenti. I livelli di catecolamine sieriche *post mortem* potrebbero riflettere l'entità dello stress di tipo fisico durante il processo di morte.
Per quanto riguarda invece lo stress di tipo mentale, tra questo e il livello di catecolamine non pare esservi correlazione (Zhu et al., 2007). Secondo Wilke et al., tuttavia, l'analisi della concentrazione di adrenalina e noradrenalina non può essere utilizzata per dettagliate indagini rivolte a determinare il tipo di morte o la durata del periodo agonico (Wilke et al., 2007);

Numerosi altri potenziali *marker* sono disponibili per investigare il processo di morte; è necessario dunque implementare gli studi, soprattutto quelli in campo animale, ed indagare più approfonditamente ciò che avviene dal punto di vista molecolare nella vittima in agonia.

Questo studio, nel comparare periodi agonici di diversa durata, si propone di indagare nel dettaglio il CRF, verificando se si tratti di un *marker* in grado di identificare e quantificare la sofferenza legata allo stress.

1.5 Che cos'è lo stress?

1.5.a La "sinfonia" dello stress

Hans Selye, medico austriaco "pioniere dello stress", nel 1936 definì lo stress come "*una reazione aspecifica dell'organismo ad una qualsiasi sollecitazione*"; l'autore osservò come negli animali vi fosse una risposta comune, a livello fisiologico, in seguito all'esposizione a stimoli esterni di tipo fisico, chimico o biologico. Tali stimoli, denominati agenti stressanti o *stressors*, inducevano nell'animale una reazione costante, caratterizzata dall'attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*, HPA) e finalizzata all'adattamento (Jackson, 2014).

Il termine "neurosinfonia dello stress" è stato usato per qualificare questo complesso sistema di risposte,

così finemente coordinato, altamente conservato durante l'evoluzione ed essenziale per la sopravvivenza (Moisan & Le Moal, 2012).

La priorità dell'organismo d'innanzi alla minaccia è quella di sopravvivere e la discriminante in questo è la capacità di adattarsi ai vari cambiamenti omeostatici; la risposta allo stress, o *stress response*, è costituita da un complesso di risposte integrate attuate in risposta ad uno stress che possa mettere a rischio il benessere del soggetto.

Gli agenti stressanti infatti arrecano una perturbazione dell'omeostasi, a cui fanno seguito l'elaborazione delle informazioni da parte del cervello e la risposta endocrina entro i nuclei paraventricolari (*paraventricular nuclei*, PVN) ipotalamici, generando una serie di reazioni che prevedono l'attivazione di diverse vie fisiologiche.

Tale sistema permette di attuare delle strategie vantaggiose: adeguamento del comportamento e ottimizzazione delle risorse energetiche attraverso la risposta "*fight, flight, freeze*".

Si tratta di una sequenza di risposte, a intensità crescente, messe in atto da un essere vivente dinnanzi ad un pericolo: durante la fase di *freeze* (immobilità) l'animale si trova in uno stato di ipervigilanza (osserva, guarda, non si muove) nel tentativo di non essere visto, questa prima risposta è seguita dal *flight or fight* ossia dal tentativo di fuga o di lotta, infine vi può essere anche la fase di *fright* (paura) caratterizzata dall'immobilità tonica dell'animale durante il contatto fisico con il predatore così da fingersi morto (Bracha, 2004).

La conseguenza sistemica dello stress consta inoltre di alterazioni a livello cellulare e molecolare, come la modulazione dei neurotrasmettitori, le alterazioni nella morfologia dendritica e della densità recettoriale e i cambiamenti nella trasduzione del segnale (Herman et al., 2016).

1.5.b Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene

L'asse HPA è un sistema appositamente "disegnato" per aiutare l'organismo a far fronte alle avversità e la sua importanza è sottolineata dalla conservazione che possiede nelle diverse specie di mammiferi e dal mantenimento di una risposta dinamica durante tutta la vita. Le funzioni di questo sistema integrato, anche in assenza di stress, hanno un ruolo essenziale nell'assicurare la mobilitazione e la distribuzione dell'energia ai vari organi durante la attività quotidiane. La secrezione dei glucocorticoidi (GCs) infatti è pulsatile e viene regolata dai picchi circadiani, con zenit nelle ore di maggiore attività, in genere corrispondenti al momento del risveglio (Herman et al., 2016).

Questo rappresenta solo uno dei tanti "sistemi" endogeni implicati nella risposta allo stress (tra questi annoveriamo il Sistema Nervoso Autonomo -SNA-, il rilascio di prolattina- secreta dall'ipofisi ma non

facente parte dell'asse - e di ormoni sessuali gonadici etc.); grandi lesioni a carico dei PVN ipotalamici infatti non bloccano completamente il rilascio di ACTH, suggerendo che i neuroni secretori del PVN non siano i soli attivatori della risposta stressoria. Il circuito in questione prevede la messa in moto successiva di tre distinti organi: ipotalamo, ipofisi e ghiandole surrenali, ognuno dei quali esercita un suo intrinseco controllo sul rilascio finale dei GCs.

Il risultato finale è la mobilitazione dell'energia così da assicurare all'organismo risorse utili alla risposta adattativa per far fronte alle minacce fisiche, reali o percepite che siano. Vengono dunque attivati i sistemi respiratorio, cardiaco e muscolare con conseguente aumento del battito cardiaco, della pressione sanguigna e della produzione epatica di glucosio etc.; al contrario l'attività dei sistemi non immediatamente essenziali (digestivo, riproduttivo, di crescita, etc.) è ridotta al minimo (Herman et al., 2016).

1.5 Attivazione dell'asse HPA e meccanismo d'azione

L'attivazione dell'asse HPA ha inizio in seguito ad una neurotrasmissione di tipo eccitatorio a livello dei neuroni dei PVN ipotalamici, deputati a rilevare le alterazioni omeostatiche (Herman et al., 2016).

I neuroni secernenti presenti nel PVN rilasciano quindi il CRF e la vasopressina (AVP), la quale agisce sinergicamente al CRF per intensificare la risposta allo stress.

Tali ormoni, tramite il sistema portale ipofisario, giungono all'adenoipofisi e qui stimolano il rilascio dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) nella circolazione (il CRF induce la trascrizione del gene della pro-opiomelanocortina -POMC- che codifica per l'ACTH).

Una volta che l'ACTH ha raggiunto la zona fascicolata della corticale della ghiandola surrenale in concentrazioni adeguate, si lega ai recettori melanocortin-2 (MC2R) inducendo un aumento della sintesi dell'adenilato ciclasi (AC).

Tale incremento, dipendente dai livelli di adenosin monofosfato ciclico (cAMP) intracellulare, conduce ad un rapido incremento della sintesi di colesterolo. Quest'ultimo, precursore dei GCs (oltre che di altri steroidi, compresi i mineralcorticoidi), viene trasportato dai siti di accumulo alla membrana mitocondriale esterna.

Qui la proteina regolatoria acuta steroidogenica (StAR), proteina di trasposto e fattore critico limitante nella sintesi degli ormoni steroidei, ne facilita il movimento verso la membrana interna e dunque il raggiungimento dell'enzima Citocromo P450. I GCs, una volta sintetizzati, sono rilasciati nella circolazione e si diffondono a varie aree periferiche e al Sistema Nervoso Centrale (SNC) (Fig.1.1).

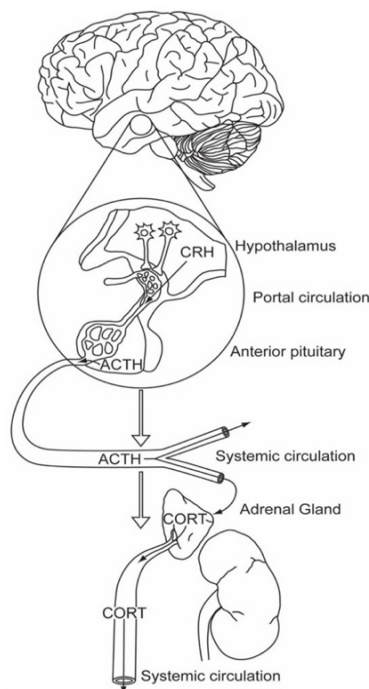


Fig.1.1 Organizzazione dell'asse HPA: la risposta allo stress inizia tramite il rilascio di CRF da parte dei PVN ipotalamici. A livello dell'adenoipofisi il CRF stimola il rilascio di ACTH entro la circolazione sistemica cosicché promuova la sintesi e la secrezione dei GCs (cortisolo o corticosterone a seconda della specie) a livello di corteccia surrenale. I GCs sono quindi secreti nella circolazione sistemica e da qui possono legarsi ai recettori affini presenti in ogni organo incluso il cervello (Herman et al., 2016).

1.6.a Vasopressina e stress

La vasopressina (ADH) viene prodotta a livello dei PVN ipotalamici, in particolare essa è secreta dai neuroni magnocellulari (direttamente nella circolazione periferica) e dai neuroni parvocellulari (nel circolo portale ipofisario) (Aguilera et al., 2008). A livello di questi ultimi, l'ADH viene co-espressa insieme al CRF potenziando la secrezione di ACTH e cooperando quindi nella regolazione dell'asse HPA (Makara, Mergl, & Zelena, 2004).

Essa sembrerebbe dunque avere un ruolo nella risposta allo stress (sia di tipo acuto che cronico), quantomeno nel potenziare l'effetto del CRF, tuttavia esistono opinioni contrastanti al riguardo e saranno necessari ulteriori studi per comprenderne appieno il ruolo (Aguilera et al., 2008) (Makara, Mergl & Zelena, 2004).

1.6.b Tempi di risposta

La durata di attivazione dell'asse HPA dipende dalla modalità e dal protrarsi dello stimolo: le diverse molecole coinvolte hanno infatti ciascuna nicchie spazio-temporali specifiche.

In genere i neurotrasmettitori (noradrenalina, serotonina, dopamina) e i peptidi (CRH, AVP) agiscono molto rapidamente, in pochi minuti - o addirittura secondi - dopo l'insorgenza del fattore di stress, e cessano la loro attività altrettanto rapidamente. Essi esercitano le loro azioni attraverso recettori di membrana accoppiati a proteine G che trasferiscono rapidamente la loro attivazione agli effettori a valle, alterando così il funzionamento dei neuroni che esprimono questi ultimi recettori.

I GCs invece si legano ai recettori intracellulari (MRs e GRs) che poi migrano verso il nucleo, dove agiscono come fattori di trascrizione alterando l'espressione genica e, quindi, la funzione di alcune cellule (Moisan & Le Moal, 2012).

La risposta in genere inizia entro pochi minuti con la secrezione pulsatile di ACTH (il picco sopraggiunge in 15 minuti circa) e perdura relativamente poco in relazione alla durata e all'intensità dello stress e al meccanismo di *feedback* rapido di tipo non genomico.

A causa del tempo necessario all'ACTH per raggiungere la corteccia delle ghiandole surrenali e il tempo indispensabile per la sintesi e il rilascio di GCs, c'è un sostanziale ritardo (in genere di 30-60 minuti) tra il picco corticosteroidi e quello di ACTH (Herman et al., 2016) (Fig.1.2).

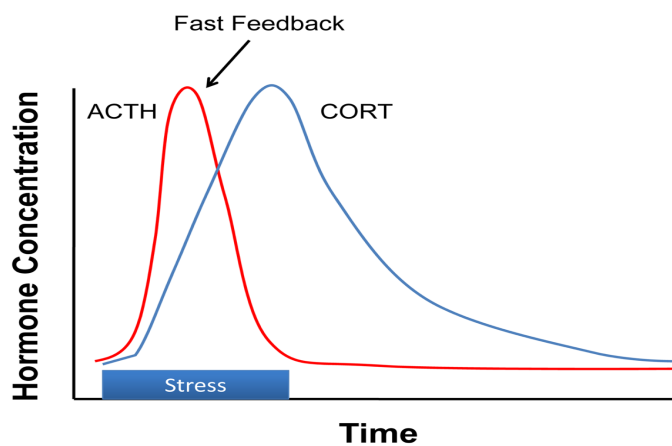


Fig.1.2 Dinamiche temporali dell'asse HPA nella risposta allo stress (Herman et al., 2016).

1.6.c Asse HPA: feedback negativo

Iniziare in maniera efficiente la risposta allo stress, dato che questa aumenta le probabilità di sopravvivenza, è essenziale.

Ugualmente importante è, però, anche la fase finale dell'evento, poiché i GCs sono metabolicamente gravosi e i loro effetti catabolici possono portare a cambiamenti patologici sistemici in seguito ad una loro produzione prolungata. I GCs sono dunque coinvolti in un apparente paradosso di comunicazione: mentre l'esposizione a questi ormoni steroidei promuove la sopravvivenza di un organismo durante uno stress acuto, questi stessi ormoni in condizioni di cronicità possono causare un danno e predisporre alla patologia.

L'asse HPA è un sistema dinamico la cui risposta è modulata in base ai ritmi circadiani di secrezione dei GCs. Il *feedback* negativo, esercitato dagli stessi GCs che si legano ai propri recettori di membrana GRs, è essenziale per mantenere la risposta entro i limiti fisiologici ponendo fine alla secrezione endocrina inibendo la liberazione di CRF e ACTH.

1.6.d Meccanismo di inibizione

La fase di discesa o "*falling phase*" è caratterizzata da una rapida interruzione del rilascio di ACTH ed è seguita da un graduale ritorno dei GCs a livello basale. Questo processo si esplica attraverso l'attenuazione dell'attività del Tronco Encefalico e con l'inibizione trans-sinaptica delle strutture limbiche, per terminare sui PVN ipotalamici come una sommatoria di più circuiti interconnessi.

I GCs esercitano il proprio *feedback* negativo attraversando la barriera ematoencefalica tramite effetti rapidi (non genomici) e lenti (genomici) sulle varie regioni neuronali che regolano il rilascio di ACTH.

A livello dei PVN ipotalamici, in particolare, sono espressi molti GRs che mediano velocemente il *feedback* negativo sui neuroni produttori di CRF. Tale *feedback* è di tipo non genomico e dipende sia da sostanze cannabinoidi che da meccanismi gabaergici: i GCs stimolano infatti la sintesi e il rilascio di sostanze endocannabinoidi a livello dei PVN, legandosi ai recettori di membrana per i mineralocorticoidi (MRs).

Gli endocannabinoidi si legano infine ai recettori presinaptici CB1 così da sopprimere la trasmissione glutammatergica e inibire l'attivazione dei neuroni del PVN ipotalamico. I GCs inoltre si legano ai recettori dei neuroni inibitori magnocellulari dei PVN ipotalamici così da stimolare il rapido rilascio, proteina G dipendente, del GABA inibendo a valle la secrezione di CRF.

La somministrazione esogena di GCs a livello dei PVN ipotalamici, attuata in uno studio di Herman, si è infatti tradotta in un rapido decremento di espressione dell'mRNA del CRF con conseguente calo d'attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (HPA) (Herman et al., 2016).

1.6.e Stress cronico: risposta adattativa o maladattativa

Le situazioni stressanti a cui può andare incontro un soggetto sono molto varie: possono essere lievi o intense, acute, ripetute o croniche. La predazione, ad esempio, rappresenta uno stress acuto e forte, mentre la mancanza d'acqua è uno stress cronico e intenso.

I meccanismi neurali che regolano le risposte di tipo cronico vanno distinti da quelli che controllano le risposte acute, in molti casi infatti le regioni coinvolte non sono necessariamente le stesse.

Per quanto riguarda lo stress di tipo cronico e l'abituazione allo stesso, questa sembra essere mediata, almeno in parte, dal nucleo talamico paraventricolare (PVT) (strettamente connesso alle strutture del sistema limbico) che va incontro ad attivazione selettiva in seguito alla presentazione di agenti stressanti familiari (con i quali il soggetto è già entrato in contatto).

Lo stress cronico, una volta indotta l'attivazione dell'asse HPA, prende molte forme (ipersecrezione cronica basale, sensibilizzazione alle risposte allo stress, esaurimento surrenale), con manifestazioni che dipendono da fattori come cronicità dello stress, intensità, frequenza e modalità.

Stress intensi o cambiamenti di lunga durata (es. stimolo infiammatorio) suscitano delle risposte più prolungate; risposte a breve termine sono invece osservate in seguito all'esposizione a stress psicologici (ad esempio il contenimento, usato come mezzo stressorio nei roditori).

Come già detto, la migliore opzione dell'organismo consiste nell'intraprendere una risposta il più possibile efficiente nei confronti dello stimolo stressorio, limitandone però il protrarsi nel tempo grazie ad un adeguato sistema di *feedback* negativo. La reazione individuale a stimoli di varia natura è determinata da diversi fattori includenti la genetica, le prime esperienze di vita, le condizioni ambientali, il sesso e l'età, oltre che il contesto in cui l'agente disturbante si verifica.

Ad ogni situazione corrisponde dunque una specifica risposta: in caso di situazioni prevedibili, la risposta potrà essere anticipatoria e adattativa, in caso di situazioni protratte nel tempo, questa sarà mal adattativa e patologica (Herman et al., 2016).

1.6.f L'abituazione

Lo stress cronico può implicare un processo cumulativo che si traduce in un'alterazione somatica degli organi dell'asse HPA (tra cui, ad esempio, l'aumento di volume delle ghiandole surrenali). L'esposizione ripetuta ad un medesimo agente stressante può inoltre portare ad un'umentata secrezione basale di GCs. Questo accade in seguito alla diminuzione dei tassi di risposta e alla determinante diminuzione dell'espressione recettoriale, conseguente alla perdita del controllo di *feedback* negativo sull'asse.

La risposta, per un fenomeno di abituazione, tende a diminuire nel tempo ma non scompare (Fig.1.3). Non tutti gli stress ripetuti hanno tuttavia come conseguenza l'abituazione: risposte a stress più gravi, come l'esposizione ripetuta alla predazione, sono mantenuti nel tempo, probabilmente a causa dell'alto costo richiesto per adattarsi a particolari situazioni. Nonostante il fenomeno dell'abituazione, la risposta dell'asse HPA ad un nuovo agente stressorio è mantenuta o aumentata, indicando l'esistenza di un meccanismo che guida l'asse nonostante l'aumento dei segnali di *feedback* negativo generati dall'aumento episodico o cumulativo dei GCs. L'esposizione ad un precedente agente di disturbo facilita anzi la risposta dei GCs, rilasciati più facilmente e a dosi maggiori (Herman et al., 2016).

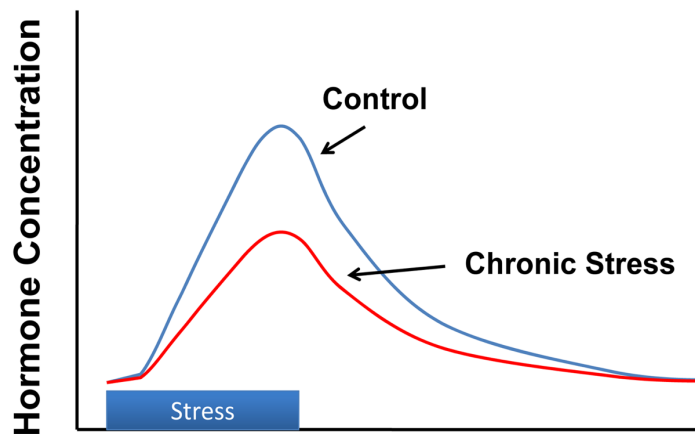


Fig.1.3 In questo grafico si vede come nella risposta a stress di tipo cronico, ripetuto o prevedibile, vi sia un'abituazione ai GCs (Herman et al., 2016).

1.6.g Recettori dei Glucocorticoidi

I GCs, a livello cerebrale, si legano a due sottotipi recettoriali: il recettore dei mineralcorticoidi (MR) e il recettore dei glucocorticoidi (GR); entrambi appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari e funzionano come fattori di trascrizione regolando l'espressione genica.

L'equilibrio tra i recettori MRs e GRs, la loro unione con i ligandi e il loro meccanismo d'azione, sono intricatamente coinvolti nella regolazione dell'asse HPA.

I MRs sono dotati di maggiore affinità di legame con i GCs e regolano l'attività dell'asse in relazione ai ritmi basali circadiani, con picco coincidente alla fase di risveglio (tali recettori divengono quasi completamente saturati durante i picchi circadiani e nei momenti di stress). Essi hanno una distribuzione limitata e massimamente espressa a livello ippocampale.

I GRs invece sono ubiquitari, ma comunque maggiormente espressi a livello di ippocampo, amigdala, cervelletto, ipotalamo (soprattutto nei PVN ipotalamici) (Fig.1.4), neuroni delle vie aminergiche ascendenti del tronco encefalico e, in minor misura, nel nucleo caudato e nel putamen. I GRs sono attivati solo quando i livelli di GCs raggiungono concentrazioni elevate, prossime a livello di saturazione dei MRs, come avviene durante un evento stressante di tipo acuto o durante lo zenit del ritmo circadiano. Essi medierebbero quindi le azioni di *feedback* successive allo stress (Herman et al., 2016), (Wang & Harris, 2015).

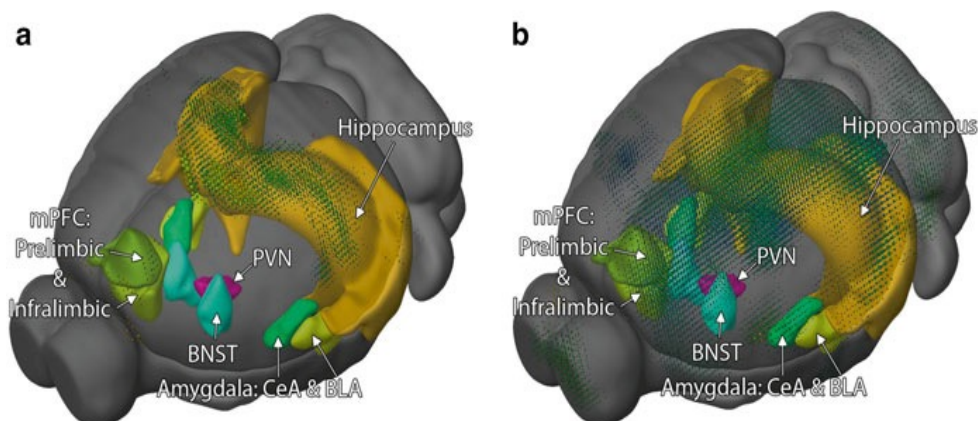


Fig.1.4 Colorazione verde scuro che evidenzia in a) la distribuzione dei MRs nel cervello di topo e in b) la distribuzione dei GRs nel cervello di topo (Wang & Harris, 2015).

1.6.h Principali funzioni dei Glucocorticoidi

Come sopra riportato, i GCs hanno un ruolo centrale nella risposta cerebrale allo stress, agendo a livello di siti diversi, nel regolare sia il livello basale che il picco di funzionamento dell'asse HPA.

La principale funzione dei GCs sull'omeostasi del glucosio è quella di preservarne i livelli plasmatici, rendendolo disponibile per il cervello durante lo stress. Un temporaneo aumento della glicemia è infatti importante per promuovere la massima funzione cerebrale. I GCs sono quindi in grado di modulare le funzioni cerebrali così da coordinare adeguati comportamenti stress-responsivi.

Il rilascio dei GCs dalla ghiandola surrenale, sia in condizioni basali sia in corso di stress acuto o cronico, è di tipo pulsatile.

La moltitudine di risposte agli stimoli disturbanti possono dipendere dal momento in cui questi ultimi si verificano rispetto alla secrezione circadiana: quelli che si verificano nella fase di picco produrranno una liberazione maggiore di GCs. La pulsatilità è una funzione particolarmente importante dell'asse HPA, poiché un'alterazione della stessa (conseguente ad esempio alla costante disponibilità di GCs) distrugge la funzionalità dei GRs (James P. Herman et al., 2016). Tali ormoni inoltre sono in grado di modificare le componenti del sistema limbico, sia strutturalmente che funzionalmente, apportando alterazioni della plasticità neuronale, della neurogenesi, variazioni della memoria e della capacità di apprendimento, oltre che modificazioni comportamentali.

I GCs infine possono esercitare un *feedback* positivo su alcuni distretti, soprattutto in condizioni di stress cronico, come ad esempio nel nucleo amigdaloido, dove stress ed elevati livelli di GCs conducono ad un aumentata secrezione di CRF con conseguente aumento della reattività dell'asse (James P. Herman et al., 2016).

1.6.i Il Sistema Limbico: funzioni e modificazioni

L'azione sinergica di tutte le molecole mediatrici di stress finora viste è resa possibile dalla convergenza spaziale delle loro azioni, sotto forma di reti, a livello del sistema limbico (SL) e delle sedi di sintesi dei neurotrasmettitori (*locus coeruleus*). Ogni mediatore ha caratteristiche specifiche, tuttavia il suo contributo funzionale alla risposta allo stress dipende dall'interazione con gli altri mediatori attraverso un sistema di interconnessioni (Moisan & Le Moal, 2012). Le strutture limbiche, inoltre, sintetizzando informazioni sensorie multimodali riguardanti lo stimolo e informazioni mnemoniche riguardanti la potenziale minaccia, sono in grado di generare risposte anticipatorie e derivanti da stimoli psicologici (Herman et al., 2016). Secondo recenti studi, gli *input* provenienti dai vari elementi del SL convergono

a livello dei PVN ipotalamici, così da attivare i neuroni produttori di CRF, integrando le informazioni stressorie, eccitatorie ed inibitorie in modo da ottimizzare la risposta finale.

Le quattro principali regioni del SL implicate nella regolazione e nella sintesi di CRF sono: i PVN ipotalamici, l'amigdala, la corteccia mediale prefrontale (mPFC) e l'ippocampo (Fig.1.5).

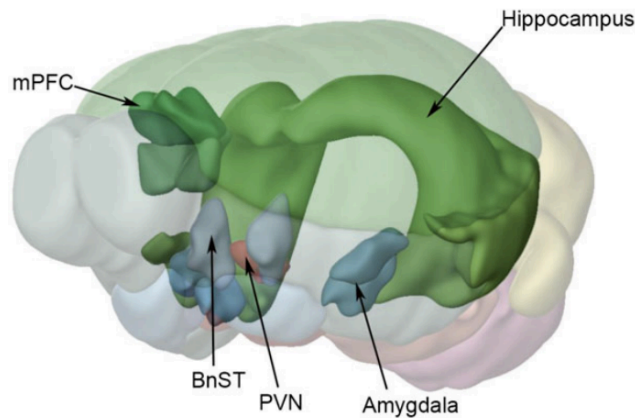


Fig.1.5 Le strutture limbiche coinvolte nella regolazione dell'asse HPA: i PVN ipotalamica, l'amigdala, la mPFC e il BnST (*the Bed nucleus of the Stria Terminalis*) che rappresenta una via di proiezione dei neuroni presenti nei nuclei dell'amigdala (Wang & Harris, 2015), (De Lahunta & Glass, 2009).

L'ipotalamo in particolare ha un ruolo chiave all'interno del SL, essendo il centro di integrazione delle informazioni afferenti dalle altre regioni (Moisan & Le Moal, 2012).

Il *locus coeruleus*, situato a livello del tronco encefalico, è il più grande gruppo di neuroni noradrenergici del Sistema Nervoso Centrale (SNC), nonché il nucleo maggiormente coinvolto nella via neuronale che controlla l'eccitazione e le funzioni autonome. Pur non facendo direttamente parte del SL, esso è strettamente coinvolto nella risposta allo stress (Atzori et al., 2016). Il LC infatti interagisce con l'amigdala, che ha un ruolo chiave nell'orchestrare le risposte comportamentali e biologiche agli eventi disturbanti. Queste due strutture sono dunque interconnesse tramite reciproche proiezioni neurali e provocano una pronta attivazione dell'encefalo. Dopo una prima fase di percezione inconscia, l'attivazione dell'amigdala è, in una seconda fase, modulata attraverso connessioni neurali, da un lato con la mPFC (regione che determina la valutazione cognitiva delle informazioni ricevute) e, dall'altro, con l'ippocampo (una struttura chiave nella memoria di esperienze simili già vissute) (Fig.1.6).

L'intervento di queste strutture cerebrali contribuisce in larga misura alla variabilità individuale osservata nelle risposte allo stress.

La stimolazione dell'amigdala porta al rilascio rapido di nuovi neurotrasmettitori come dopamina, acetilcolina, serotonina e noradrenalina, e peptidi come il CRF, le cui cellule produttrici sono interconnesse con il LC. Questi fattori consentono l'eccitazione emotiva, una maggiore vigilanza e l'elaborazione delle informazioni ricevute, e portano a una scelta della strategia ottimale per affrontare lo stress (Moisan & Le Moal, 2012). Il CRF stesso è in grado di agire su LC portandolo a sintetizzare e rilasciare noradrenalina, stimolando nel contempo la liberazione surrenalica di catecolamine.

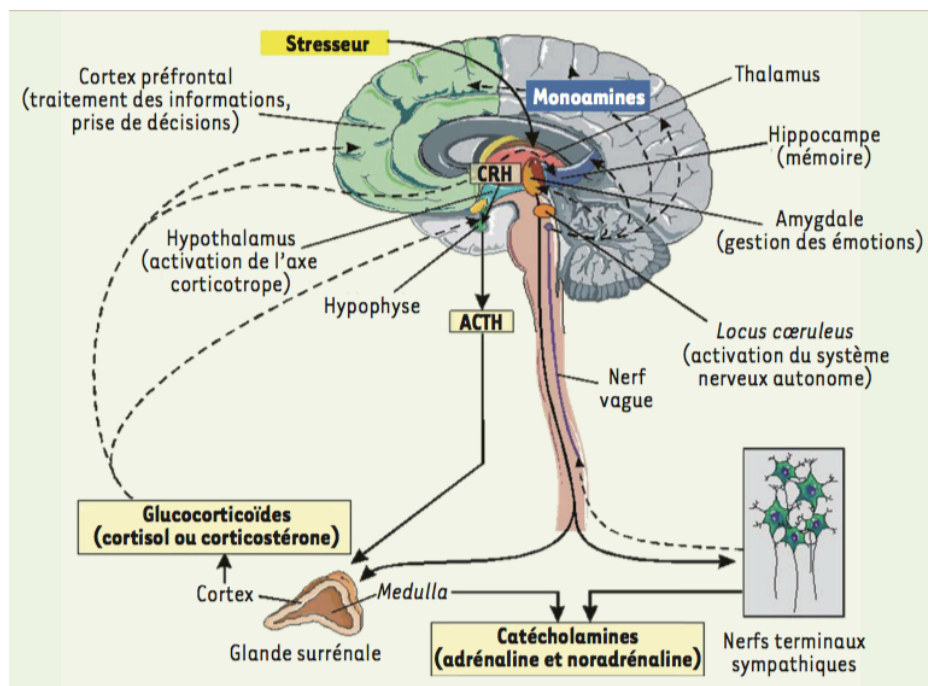


Fig.1.6 I mediatori biologici implicati nella risposta allo stress e le reti neurali interconnesse (Moisan & Le Moal, 2012).

1.6.1 Influenza del sesso

Tra i principali modulatori fisiologici dell'asse HPA ci sono gli steroidi gonadici: esiste una sostanziale differenza nella durata e nell'entità della risposta allo stress tra maschi e femmine in relazione agli ormoni sessuali. Il testosterone infatti inibisce la reattività allo stress mentre l'estradiolo sembra aumentarla. I diversi tipi di risposta dell'asse HPA potrebbero essere spiegati da meccanismi di *feedback* e necessità energetiche dissimili tra maschio e femmina (Herman et al., 2016).

1.6.m Influenza di età e sviluppo

Con il passare dell'età, le risposte dell'asse HPA possono variare molto in relazione alla maturazione delle ghiandole surrenali e alla loro sensibilità all'ACTH. Lo sviluppo dell'asse è altamente influenzato dalle interazioni materne: una prolungata deprivazione materna esita infatti in una reazione eccessiva dell'asse HPA nella prole. Al contrario, brevi separazioni conducono la prole ad avere una minor reattività allo stress nella vita adulta. Cuccioli di madri attente, in termini di frequenza di leccamento e *grooming*, sono meno predisposti a reazioni stress-responsive in età adulta.

Inoltre, è stato dimostrato anche come, con l'avanzare dell'età, aumentino la funzione basale dell'asse e la responsività allo stress. Si pensa che l'aumentata secrezione di GCs sia il risultato della perdita di *feedback* negativo verso i GCs, soprattutto in relazione alla perdita di GR nei circuiti ippocampali. Sembrerebbe che anche le anomalie genetiche, lo stress precoce e i traumi possano portare ad un aumento della sensibilità e ad una minore resilienza e capacità di adattarsi al cambiamento, sia esso positivo o negativo indifferentemente (Herman et al., 2016).

1.7 Focus sul CRF

1.7.a Il Fattore di Rilascio della Corticotropina

Il CRF, peptide di 41 aminoacidi, è un'importante molecola regolatrice sintetizzata dai neuroni dei PVN ipotalamici.

La struttura amminoacidica del CRF canino mostra un'omologia del 100% con quello umano, di ratto e cavallo e un'alta omologia con quello di maiale, bovino, pecora e pesce. Questi dati evidenziano l'alta conservazione di tale peptide tra le diverse specie e rafforzano l'importanza del suo ruolo nei mammiferi (Smagin, Heinrichs, & Dunn, 2001). Esso è infatti il principale regolatore dell'asse HPA, costituisce il maggior agente stimolante la secrezione di Corticotropina (ACTH) ed, essendo in grado di coordinare le risposte autonome e comportamentali, risulta essere un mediatore importante della risposta allo stress (Smagin, Heinrichs, & Dunn, 2001).

1.7.a.1 *La scelta del CRF*

Per i motivi fin qui detti, in questo studio si è scelto di indagare nello specifico l'espressione del CRF ipotalamico.

Determinante nella scelta è stata anche l'area di interesse (PVN), frequentemente campionata nel corso delle necrosopie e di facile individuazione.

1.7.a.2 *La famiglia del CRF*

Il CRF appartiene ad una famiglia comprendente almeno altre tre proteine: l'urocortina (UCN), la sauvagina (negli anfibi) e l'urotensina (nei pesci). Tale famiglia comprende inoltre due recettori e una proteina di legame del CRF, rispettivamente: CRF-R1, CRF-R2 e CRFbp (CRF *binding protein*). I recettori differiscono molto tra loro per distribuzione anatomica e profili farmacologici (Wang & Harris, 2015).

Nel suo complesso dunque la risposta adattativa vede coinvolti diversi neuropeptidi. Studi farmacologici comparativi sugli agonisti dei recettori del CRF suggeriscono infatti che UCN, sauvagina e urotensina mimino funzionalmente le conseguenze dell'esposizione ad uno stress.

Si è quindi suggerito che possano esistere altri agonisti endogeni per i recettori del CRF e che i meccanismi regolatori siano dunque significativamente più complessi rispetto a quanto si pensasse un tempo (Smagin, Heinrichs, & Dunn, 2001).

1.7.a.3 *Urocortina*

L'UCN, peptide di 40 amminoacidi con il 45% di omologia al CRF, identificata nel cervello (Fig.1.7) e negli organi periferici dei mammiferi (ad esempio nel cuore), si lega al CRF-R1 e, soprattutto, al CRF-R2 (Wang & Harris, 2015).

In uno studio eseguito su una coorte di topi, è stato evidenziato come, dopo un'ora di contenimento forzato, i livelli di mRNA di UCN nell'ipotalamo e nel mesencefalo aumentassero in maniera significativa (Steckler & Holsboer, 1999).

Inoltre la somministrazione esogena di CRF e UCN produce attivazione comportamentale, aumentata risposta allo stress, comportamenti di tipo aversivo (Smagin et al., 2001). Tutti gli studi disponibili riportano effetti comuni (soppressione dell'appetito, attivazione locomotoria e comportamenti ansiogenici) conseguenti alla somministrazione di agonisti del CRF. La forte evidenza del ruolo dei neuropeptidi CRF-like nella risposta comportamentale agli stress deriva inoltre dalla dimostrazione degli effetti anti-stressori che gli antagonisti esercitano sui recettori CRF (Smagin, Heinrichs, & Dunn, 2001).

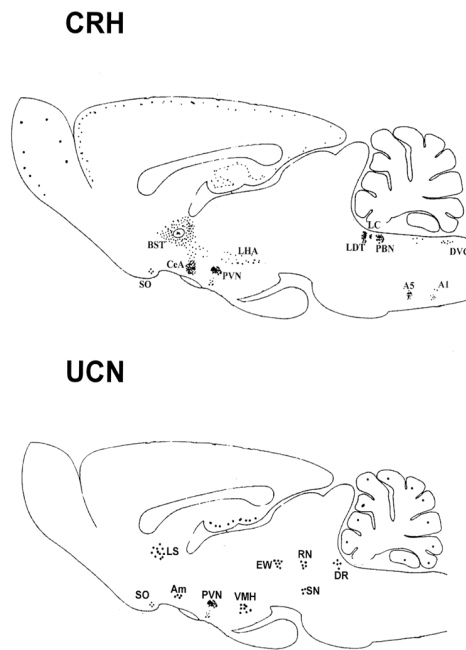


Fig1.7 Comparazione della distribuzione delle cellule immunoreattive al CRF (CRH) e all'UCN nel cervello di un roditore (Smagin, Heinrichs, & Dunn, 2001).

1.7.a.4 Distribuzione del CRF

Una vasta distribuzione di neuroni immunoreattivi al CRF è stata rilevata nel cervello, nei tessuti periferici e in diverse cellule infiammatorie (e.g. gh. surrenali, placenta, testicoli, linfociti B e T e neutrofili) del ratto. Per quanto riguarda il cane, i neuroni immunoreattivi al CRF sono stati trovati soprattutto a livello dei PVN dell'ipotalamo, mentre le fibre immunoreattive sono state rilevate soprattutto a livello dell'eminenza mediana.

Alcuni neuroni extratalamici contenenti CRF sono stati osservati nel nucleo parabrachiale, nell'ipotalamo laterale, nel cervelletto, nel nucleo della stria terminale (dove esso gioca un ruolo nell'ansia stress-correlata), nel nucleo accumbens (dove agisce invece sopprimendo il rilascio di dopamina in risposta alla ricompensa e spostando il comportamento da appetitivo ad aversivo), a livello del nucleo centrale dell'amigdala e dell'ippocampo (dove è coinvolto nella memoria emozionale stress-correlata, nell'ansia e nei processi di apprendimento) (Steckler & Holsboer, 1999).

1.7.a.5 Tipi recettoriali: distribuzione e funzione

CRF-R1 e CRF-R2 sono recettori di membrana accoppiati a proteina G, detti "*corticotropin releasing hormone receptor*" (CRF-R), ed attivano l'adenilato ciclastasi (AC) portando al rilascio di ACTH (Herman et al., 2016). CRF e UCN sono attivi in entrambi i tipi di recettore noti, tuttavia la loro affinità è relativa al sottotipo recettoriale specifico.

Pare che i recettori CRF-R1 possano essere maggiormente implicati nella sfera cognitiva, ossia nell'attenzione, nelle funzioni esecutive, nelle emozioni e forse nell'apprendimento e nella memoria; i recettori CRF-R2 invece parrebbero influenzare primariamente i processi legati alla sopravvivenza, come il nutrirsi, il riprodursi e il difendersi (Steckler & Holsboer, 1999).

La conoscenza riguardo le interazioni delle varie componenti del sistema CRF è tuttavia al momento limitata, data la mancanza di strumenti farmacologici adeguati (come agonisti e antagonisti altamente selettivi per i sottotipi recettoriali) e anche perché non sono stati ancora identificati tutti i ligandi e i recettori coinvolti.

Attualmente è noto che i recettori CRF-R1 e CRF-R2 hanno una diversa distribuzione: CRF-R2 ha una maggiore espressione nel setto laterale, nel nucleo ventro-mediale dell'ipotalamo e in diversi nuclei dell'amigdala; l'mRNA del recettore CRF-R2 non è stato rilevato nella neocorteccia né nella corteccia cerebrale, tuttavia in queste stesse regioni è stata rilevata un'elevata espressione del recettore CRF-R1. In modo simile, l'espressione di CRF-R2 è quasi nulla nei lobi ipofisari, mentre quella del recettore CRF-R1 è alta. I recettori di CRF sembrano infatti deputati a regolare meccanismi di difesa opposti: in particolare il CRF-R1 sarebbe implicato nella risposta a stress eludibili ed alla paura, mentre il CRF-R2 nel ristabilire l'omeostasi in seguito agli effetti esercitati dal primo e nella risposta a stress non eludibili. Il significato funzionale dei recettori CRF-R2 rimane poco chiaro ma si è visto come una diminuita espressione di tali recettori, ottenuta in seguito all'utilizzo di oligonucleotidi *antisense* verso l'mRNA degli stessi, non influisca sui comportamenti *anxiety-like*. Tuttavia, il trattamento *antisense* selettivo verso i recettori CRF-R2 influisce solo su alcune delle performance dei ratti (valutati in seguito ad alcuni test) e non su altri comportamenti stress-correlati: ciò suggerisce un ruolo dei recettori CRF-R2 nelle strategie di adattamento messe in atto in situazioni di disturbo (Steckler & Holsboer, 1999). Per quanto riguarda invece i recettori per UCN, la loro diversa distribuzione rispetto ai recettori di CRF nel cervello di ratto suggerisce che questi due peptidi abbiano ruoli fisiologici distinti, ma questo ancora non è stato dimostrato e richiede ulteriori studi (Smagin, Heinrichs, & Dunn, 2001).

2.SCOPO E STRUTTURAZIONE DELLO STUDIO

Il presente studio, alla luce di quanto evidenziato nei precedenti paragrafi e alla relativa mancanza di studi nel settore veterinario rispetto a quello umano, ha lo scopo di approfondire il tema dello stress nella specie canina, contestualizzandolo nel campo della necropsia forense, così da indagarne il possibile ruolo come indicatore discriminante il tipo di agonia subito dalla vittima.

La ricerca è stata articolata in due fasi: dopo la prima fase di selezione dei campioni, si è proceduto all'analisi dell'espressione immunohistochimica del CRF a livello dei PVN ipotalamici, allo scopo di valutare il potenziale ruolo nella risposta stressoria.

Le immagini ottenute dalla scansione dei vetrini sottoposti alla colorazione immunohistochimica sono state quindi analizzate mediante *software* informatici in grado di quantificare e localizzare la distribuzione la positività del CRF nell'area di interesse.


I dati così ottenuti sono stati infine indagati attraverso dei test statistici al fine di verificarne la significatività in relazione al tipo di morte e alla durata del periodo agonico.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Selezione dei casi

3.1.a Provenienza dei campioni

Per questo studio sono state selezionate 140 sezioni di tessuto encefalico di origine canina dall'archivio del dipartimento di Patologia Veterinaria e Salute Pubblica dell'Istituto di Scienze Veterinarie dell'Università di Liverpool. Tale dipartimento dispone di un'ampia collezione di campioni istopatologici relativi alle numerose necrosopie forensi eseguite nel corso degli anni, con relativo report fotografico descrittivo (nella sezione PROTOCOLLI E ALLEGATI a pagina 85 è disponibile a titolo d'esempio un report completo relativo ad uno dei casi inclusi in questo studio, nella Fig.3.1 è invece riportato un documento proforma per richiedere una necropsopia a valenza legale).



Veterinary Laboratory Services
RSPCA Post-Mortem Examination
www.liv.ac.uk/vetpathology

Animal Submissions:	<i>For Laboratory use only</i>	
Veterinary Pathology Diagnostic Services University of Liverpool Leahurst Chester High Road Neston CH64 7TE Tel: 0151 795 6294 Fax: 0151 795 6295 Email: vpserve@liverpool.ac.uk	Path. Lab. No.	
	Received	
	Necropsy Date	
	Interval between death & Necropsy	
RSPCA Tag No:	Ref Veterinary Surgeon:	
RSPCA Log No:	Practice Name and Address:	
Species: Age:	Phone: Fax:	
Breed: Sex:	Email:	
Bodyweight (Kg):	Address to be used for billing? YES / NO	
Date & time of death <input type="checkbox"/> euthanasia <input type="checkbox"/>	RSPCA Inspector:	
Retain body for evidence? YES / NO (please circle)	RSPCA Address:	
<small>Please note the body will be disposed 1 month after the date of the definitive report. Inspector is responsible for organising collection prior to this date.</small>	Phone: Fax:	
Priority <input type="checkbox"/> HIGH* <input type="checkbox"/> LOW	Email:	
	Address to be used for billing? YES / NO	
Clinical/Crime Scene Information		
Additional information	Indoor <input type="checkbox"/> Outdoor <input type="checkbox"/> Environmental temperature <input type="checkbox"/>	Body (rectal) temperature <input type="checkbox"/>
	Body Kept Frozen Yes/No	Date of Freezing: Date of thawing
Specific questions to answer (if applicable):		

* High priority cases will be processed and reported with priority within the cases of the week. An additional charge applies.

Fig.3.1 Documento proforma da compilare per richiedere una necropsopia da parte dell'ente RSPCA.

3.1.b Criteri di inclusione ed esclusione

Nella scelta dei casi sono state considerate le seguenti variabili (vedi TABELLE 4.1, 4.2 e 4.3 nella sezione MATERIALI E METODI):

- sesso;
- razza;
- età;
- peso (Kg);
- durata del periodo agonico (nota o adeguatamente stimata);
- intervallo *post mortem* (PMI), ovvero l'intervallo di tempo intercorso tra la morte dell'animale e il suo ritrovamento;
- causa della morte, ovvero qualsiasi lesione o *noxa* che ha iniziato la catena di eventi che ha condotto a morte l'animale;
- meccanismo di morte, ovvero il processo patogenetico conseguente alla causa di morte che ha provocato il decesso dell'animale;
- modalità di morte, ovvero la causa patologica naturale: animalicidio o morte per cause colpose o dolose, ecc., (*Linee guida nazionali per le autopsie a scopo forense in Medicina Veterinaria, 2018/2019*).

Le fasce di età considerate sono state le più ampie possibili e sono state così definite:

- cuccioli: da 0 a 7 mesi;
- giovani adulti: da 7 mesi a 3 anni;
- adulti: da 3 a 6 anni;
- adulti maturi/anziani: ≥ 7 anni.

La durata del periodo agonico è stata così suddivisa:

- immediata: meno di 1 ora;
- breve: da 1 ora a 24 ore;
- media: da 24 ore a 3 giorni;
- lunga: da 3 giorni a settimane.

La durata del periodo *post mortem* è stata così suddivisa:

- breve: entro le 24 ore;
- media: tra le 24 e le 72 ore;
- lunga: maggiore di 72 ore.

Cause, modalità e meccanismi di morte verranno discusse più avanti sulla base della scelta dei campioni.

3.2 Area di interesse

3.2.a Encefalo: macroanatomia

L'encefalo è formato da tre regioni distinte: il cervello, il cervelletto e il tronco encefalico (mesencefalo). Dal punto di vista morfofunzionale il cervello, o prosencefalo, è suddiviso in telencefalo (emisferi cerebrali) e diencefalo (Di Leva, 2018).

Il diencefalo è formato da talamencéfalo (include talamo, metatalamo ed epitalamo), subtalamo (ventro-laterale al talamo) e ipotalamo (ventro-mediale al talamo). Tramite un'estensione ventrale ipotalamica, detta tuber cinereum, ha origine il lobo neurale dell'ipofisi, la neuroipofisi.

Le diverse regioni diencefaliche sono distribuite simmetricamente ai lati del terzo ventricolo; i numerosi nuclei ipotalamici, in particolare, sono disposti sul pavimento e sulle pareti della porzione ventrale di questo (De Lahunta & Glass, 2009).

3.2.b Nuclei Paraventricolari dell'Ipotalamo

L'ipotalamo è composto da diversi piccoli nuclei contenenti eterogenei tipi di neuroni e può essere diviso trasversalmente (dalla quella rostrale a quella caudale) in tre regioni: regione rostrale, regione intermedia e regione mamillare.

Un gran numero di neuroni immunoreattivi al CRF, per quanto riguarda la specie canina, sono stati trovati soprattutto a livello dei PVN ipotalamici (facenti parte del gruppo di nuclei della regione rostrale): qui ha infatti inizio la risposta ormonale allo stress (De Lahunta & Glass, 2009) (Fig.3.2 e 3.3).

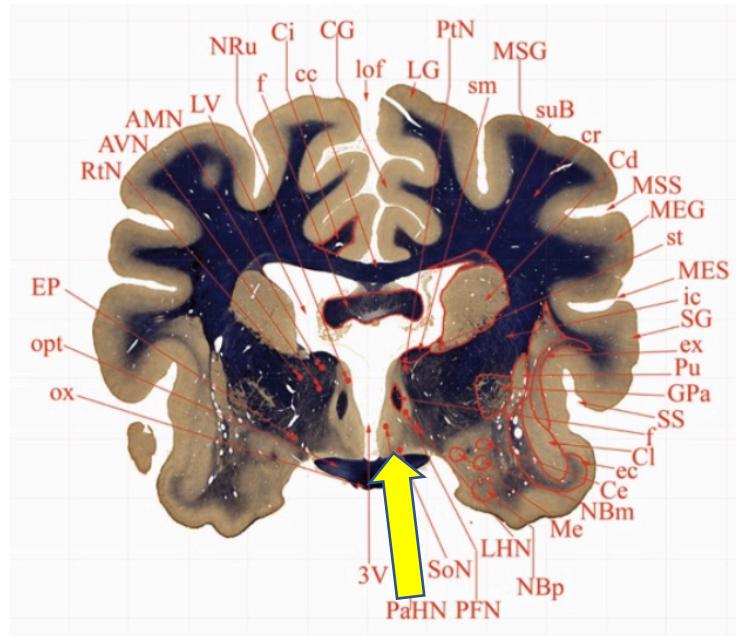


Fig.3.2 Sezione di cervello di cane di razza Beagle: alla voce PaHN è segnalato il PVN ipotalamico (*paraventricular hypothalamic nucleus*) (Palazzi, 2011).

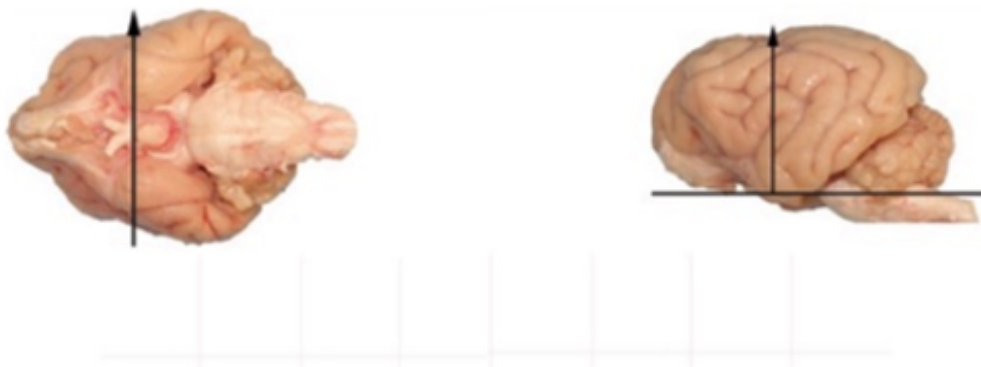


Fig.3.3 Localizzazione ventrale e laterale della sezione cerebrale su in esame (Palazzi, 2011)

3.2.b.1 *Neuroni Parvocellulari*

Il PVN ipotalamico è una regione altamente conservata composta da neuroni parvocellulari, magnocellulari e da neuroni di proiezione. I neuroni parvocellulari, soprattutto quelli a localizzazione dorso-mediale (Herman et al., 2016), proiettano i loro assoni a livello dell'eminenza mediana e secernono, a livello del sistema portale ipofisario, l'ormone di rilascio della tireotropina (TRH) e il CRF, che giungono in questo modo all'adenipofisi. I neuroni magnocellulari invece riversano ossitocina (OXT) e (ADH) a livello della neuroipofisi e i neuroni di proiezione esprimono recettori di tipo 4 per la melanocortina (MC4R) e OXT (Qin, Li & Tang, 2018).

3.3 Preparazione dei campioni

Nel corso di una necropsia forense, l'encefalo viene prelevato, valutato e sottoposto all'esame morfologico esterno senza praticare alcuna incisione; solo successivamente, viene immerso per intero nel liquido fissativo (formalina tamponata al 4%), in rapporto pari a 1:10, in un contenitore ermeticamente chiuso in grado di contenere l'encefalo senza provocarne compressioni o distorsioni (Antuofermo et al., 2018).

Presso il Dipartimento di Patologia Veterinaria e Salute Pubblica dell'Università di Liverpool, gli encefali fissati sono stati sottoposti a *trimming* per poi essere inclusi in paraffina.

Da ciascuno dei blocchetti di paraffina contenenti i campioni d'interesse, sono state in seguito tagliate sezioni di 4 µm di spessore per mezzo di un microtomo.

Le sezioni sono state quindi montate su vetrini polarizzati e spedite al servizio di Diagnostica Istopatologica del Dipartimento BCA dell'Università di Padova.

Prima della procedura di immunistochemica, i vetrini sono stati posti in stufa a 70 ° per 7 minuti così da sciogliere la paraffina in eccesso.

3.4 Indagine immunistochemica

Per valutare l'espressione del CRH nei PVN ipotalamici è stata scelta la tecnica dell'immunistochemica (IHC), che consente di localizzare specifici antigeni (Ag- *antigen*) tissutali sfruttando il legame che si viene a creare tra questi e il relativo anticorpo (Ab- *antibody*).

3.4.a Principi base di funzionamento

L'immunistochemica (IHC: *immunohistochemistry*) è una tecnica basata sulla dimostrazione della presenza di antigeni (Ag) nelle sezioni di tessuto, grazie all'azione di specifici anticorpi (Ab) che vi si legano. Essa si fonda dunque sul legame tra Ag e Ab.

La presenza degli Ag nelle sezioni di tessuto in esame viene evidenziata, quantificata e localizzata grazie ad una reazione enzimatica colorimetrica.

È dunque per tale ragione che si è deciso di utilizzare questa tecnica per evidenziare il CRF, *marker* in esame, a livello dei PVN ipotalamici così da valutarne l'espressione e compararla caso per caso.

Esistono attualmente diversi sistemi di rivelazione antigenica, quali il metodo diretto (uso di Ab marcati diretti specificamente contro l'Ag), il metodo indiretto, che prevede generalmente l'applicazione dell'affinità tra avidina e biotina, e l'utilizzo di immunocomplessi.

3.4.b Metodo indiretto o con coniugati

In questo studio è stata usata la metodica di tipo indiretto: essa si basa su un metodo di rilevazione antigenica più sensibile, in grado rilevare minori concentrazioni di Ag utilizzando una minor quantità di Ab primario e di amplificare la reazione colorimetrica, poiché ogni Ab primario può legare due Ab secondari (Ramos-Vara & Miller, 2014) (Fig.3.4).

Tale tecnica inoltre è particolarmente versatile in quanto possono essere usati una gran varietà di Ab primari, provenienti dalla stessa specie animale, reattivi verso il medesimo tipo di Ab secondario coniugato.

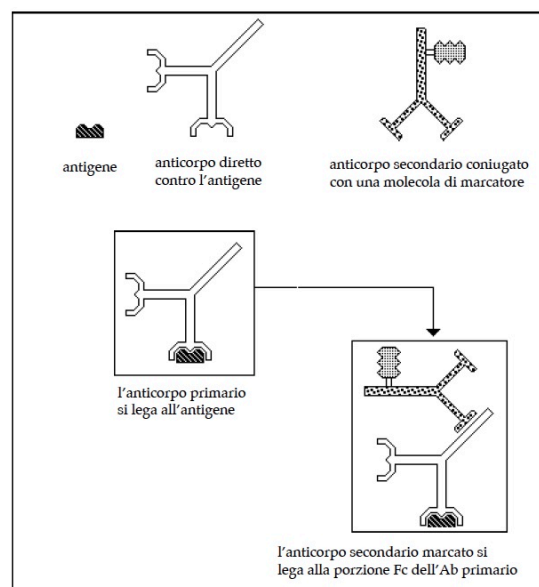


Fig.3.4 Immunoistochimica: Metodo Indiretto (Muzi, Bologna & Romani, 1999)

Entrando maggiormente nel dettaglio, tale procedura viene realizzata facendo reagire un Ab primario non marcato, specifico per l'Ag da localizzare nel tessuto, al quale si aggiunge successivamente un Ab secondario, di diversa specie animale, diretto contro l'anticorpo primario che, mediante un substrato colorato, viene infine rivelato (Muzi, Bologna & Romani, 1999).

3.4.c Metodo indiretto con Avidina-Biotina

In questa procedura, l'Ab secondario, in grado di legare all'Ab primario, è stato in precedenza biotinilato e dunque, grazie all'elevata affinità biotina-avidina (l'avidina, glicoproteina del bianco dell'uovo, è in grado di legare quattro molecole di biotina o vitamina H, presente nel tuorlo d'uovo), si lega al complesso preformato avidina, biotina ed enzima perossidasi (Boenisch et al., 2001) (Fig.3.5). A questo punto è necessario visualizzare l'enzima e quindi l'Ag grazie all'ausilio di un cromogeno appropriato. La perossidasi è un enzima che reagisce con un substrato cromogeno donatore di elettroni e la più usata è la diaminobenzidina-tetraidrocloreuro (DAB), la quale si ossida formando un precipitato insolubile di colore bruno, visibile al microscopio ottico nel punto in cui è avvenuta la reazione, così da svelarne la localizzazione dell'Ag (Muzi, Bologna & Romani 1999).

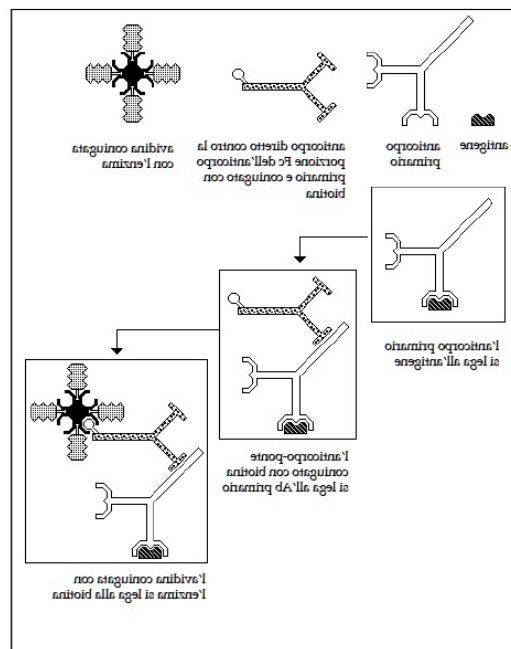


Fig.3.5 Metodo Indiretto con avidina-biotina (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.d Metodo di rivelazione con immunocomplessi

Gli immunocomplessi, costituiti da un complesso formato da un enzima, che catalizza la reazione con il cromogeno, e da un anticorpo specifico per questo enzima, rappresentano un metodo di sensibilità superiore alle metodiche diretta e indiretta.

Il vantaggio di questa metodica risulta evidente in tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina dove l'Ag può essere stato in parte distrutto dalla fissazione e dall'inclusione, con questa procedura infatti sia ha comunque una forte colorazione.

In questo procedimento vengono usati tre reagenti: l'Ab primario specifico per l'Ag, l'Ab secondario ("ponte") e il complesso costituito dall'enzima legato per via immune ad un Ab diretto contro l'enzima stesso. L'Ab ponte si lega sia all'Ab primario sia al complesso coniugato, in quanto entrambi prodotti dalla stessa specie animale, e l'enzima viene visualizzato dalla reazione tra substrato e cromogeno (Muzi, Bologna & Romani 1999) (Fig.3.6).

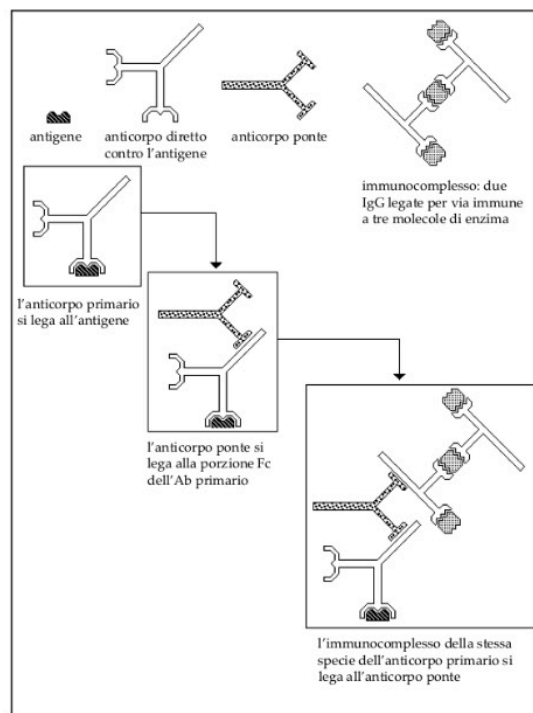


Fig.3.6 Metodo di rivelazione con immunocomplessi (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.e Blocco delle reazioni e colorazioni aspecifiche

3.4.e.1 Saturazione dei siti di legame non specifici (blocking)

La colorazione di fondo non specifica è un fenomeno conseguente al legame delle proteine con il collagene e con altri elementi a carica elevata del tessuto connettivo presenti nel campione.

I siti di legame non specifici possono essere bloccati esponendo il campione ad una soluzione proteica inerte, prima dell'applicazione dell'Ab primario, così da non lasciargli spazio d'adsorbimento.

Un esempio è rappresentato dal blocco della biotina endogena (vitamina che si lega alle proteine) presente in molti tessuti, tra cui il tessuto cerebrale, quando si usa un sistema di rivelazione basato sul legame avidina-biotina (come indicato nel manuale Abcam 2019: Immunohistochemistry IHC: the complete guide).

Le soluzioni inerti più usate sono: siero di vitello, siero di albumina bovina o siero non immune della stessa specie animale che ha prodotto l'Ab secondario.

Non tutti i campioni hanno un apprezzabile legame non specifico, pertanto in alcuni casi l'incubazione con siero non immune può essere evitata (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.e.2 *Blocco degli enzimi endogeni*

Un'altra causa di colorazione non specifica, non causata dal legame Ag-Ab, è data dalla presenza di enzimi endogeni.

Se viene usato come sistema di rivelazione un enzima identico a quello endogeno, la reazione substrato-cromogeno impiegata non potrà più distinguere tra quest'ultimo e tra l'enzima del sistema sperimentale (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.e.3 *Blocco della Perossidasi Endogena*

Per verificare l'attività della perossidasi endogena, prima di iniziare la procedura con l'Ab primario, è necessario incubare il campione con un substrato di DAB. Se essa è presente il tessuto diventerà marrone (*Abcam*). Una delle tecniche per inibire irreversibilmente la perossidasi endogena consiste nella pre-incubazione, prima della procedura di colorazione, con perossido di idrogeno in tampone fosfato salino (PBS), acqua o metanolo (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.e.4 *Blocco della Fosfatasi Alcalina Endogena*

In questo caso per bloccare l'enzima si utilizza levamisole 1mM al substrato (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.f Amplificazione

In alcuni casi, qualora vi sia una colorazione troppo debole, può essere necessario l'utilizzo di un *amplifier*, ossia di una molecola che vada ad accentuare la colorazione.

La ditta *Ventana Medical Systems* fornisce l'*Inc. (Ventana) Amplification Kit*: esso utilizza catene pesanti e leggere di IgG di coniglio anti-topo e catene pesanti di IgG di topo anti-coniglio che si legano all'Ab primario. In questo modo il numero di Ab legati all'Ag aumenta e con esso anche l'intensità della reazione colorimetrica (come indicato nel manuale Ventana: Amplification Kit, 2012).

3.4.g Controcolorazione

La scelta del tipo di controcolorazione dipende dalla soluzione substrato usata nei campioni: quelli trattati con cromogeni i cui prodotti terminali sono insolubili in alcol (ad esempio il DAB) possono essere controcolorati con coloranti alcolici, disidratati e montati con mezzi di montaggio che contengono xilene.

La procedura prevede il risciacquo del vetrino con acqua, per rimuovere il substrato che non abbia reagito, e l'incubazione con ematossilina (eccedendo nel tempo di colorazione può esservi una colorazione troppo intensa che maschera la positività della perossidasi). Infine si procede con il lavaggio seriale in alcol e xilene (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.h Anticorpi

Le immunoglobuline più usate in IHC appartengono alla famiglia delle IgG, anticorpi bivalenti dalla forma a Y le cui braccia (entrambi leganti un Ag) sono costituite ciascuna da una catena leggera e una catena pesante identiche e contenenti due regioni distinte: la metà C-terminale, detta *constant light chain* (CL) è costante, mentre la parte N-terminale, detta *variable light chain* (VL) è variabile (Ramos-Vara, 2005) (Fig.3.7).

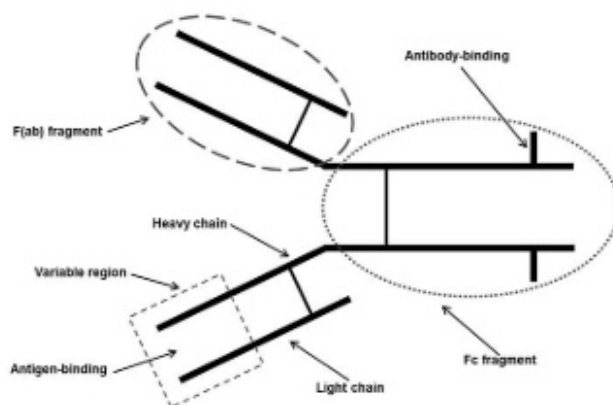


Fig.3.7 Struttura schematizzata di un IgG (Ramos-Vara, 2005)

La regione Fab (o frammento legante l'antigene) rappresenta il sito di legame Ab-Ag, la porzione Fc (o frammento cristallizzabile) determina le funzioni biologiche e permette il legame con altri Ab e con alcune cellule infiammatorie. Essa è inoltre responsabile dell'effetto di colorazione di *background* (interferenze di fondo nella colorazione) che deriva dall'aderenza degli Ab alle sezioni di tessuto.

Il sito legante l'Ag, corrispondente alle regioni variabili dell'Ab, è detto paratopo, la regione dell'Ag alla quale si lega l'Ab è invece l'epitopo.

Gli Ab derivano da peptidi sintetici con una sequenza amminoacidica nota oppure sono ottenuti da preparazioni proteiche purificate. Le seconde permettono di evitare i problemi generati dai peptidi di sintesi, tuttavia il processo di purificazione è tecnicamente difficile e possono essere presenti proteine contaminanti più antigeniche della proteina target che alterano la risposta antigenica finale (Ramos-Vara, 2005).

Gli Ab sono prelevati da animali immunizzati (topo, coniglio, capra, cavallo) con Ag purificati: l'animale risponde producendo Ab che riconoscono specificatamente e si legano all'Ag.

La qualità dell'Ab, così come la sua concentrazione, sono di primaria importanza per ottenere una colorazione il più possibile specifica. La concentrazione in particolare dipende dalla quantità dell'Ag presente nel campione da testare (considerando la possibile perdita di marker dovuta ai lavaggi, alla diffusione o alla denaturazione) e dalla sensibilità di rivelazione; se questa è eccessiva infatti possono generarsi legami aspecifici (Muzi, Bologna & Romani 1999).

3.4.h.1 Anticorpi monoclonali e policlonali

Gli Ab prodotti da un singolo clone di cellule B sono detti Ab monoclonali, mentre le preparazioni che contengono una popolazione eterogenea di Ab specifici per epitopi diversi sono dette policlonali.

L'animale usato maggiormente per la produzione degli Ab policlonali, oltre al topo, è il coniglio, per diverse motivazioni. Oltre ad una serie di vantaggi legati alla bassa reattività degli Ab umani verso le proteine dei lagomorfi, alle minori variazioni da lotto a lotto in pool di Ab prodotti da molti animali della stessa specie rispetto a pool provenienti solo da pochi animali più grandi, esso è inoltre un animale economico e facile da allevare (Boenisch et al., 2001).

3.4.h.1.1 *Vantaggi e limiti*

Gli Ab policlonali sono economici, veloci da produrre e facili da usare. Essi riconoscono più epitopi della medesima proteina *target*, anche se questa è presente a bassi livelli di espressione, permettendo dunque una rivelazione più efficace e amplificata dell'Ag. Gli Ab policlonali inoltre mostrano una buona tolleranza verso i cambiamenti minori dell'Ag (ad esempio il polimorfismo, l'eterogeneità, la denaturazione in forma lieve), a differenza degli Ab monoclonali.

Tuttavia, essendo prodotti da diverse linee clonali di plasmacellule, differiscono tra loro dal punto di vista immunochimico e possono mostrare cross-reattività verso epitopi omologhi presenti su molecole diverse, dando legami non specifici e colorazione di fondo. A questo contribuisce inoltre la presenza di una certa eterogeneità dovuta alla compresenza di Ab di forte e debole immunogenicità nella medesima preparazione (Ramos-Vara, 2005).

A tutto ciò si può in parte ovviare riducendo la concentrazione di lavoro dell'Ab e aumentando il tempo di incubazione.

Gli anticorpi monoclonali, di contro, hanno minore sensibilità, ma maggiore specificità poichè riconoscono solo un epitopo dell'Ag; questa elevata specificità può tuttavia essere d'ostacolo nel rilevare un Ag in un più vasto *range* di specie (come indicato nel manuale Abcam 2015: A comparison between polyclonal and monoclonal).

3.5 Applicazione dell'IHC allo studio

In questo studio dedicato alla rivelazione di Ag di origine canina, in conseguenza dei temi precedentemente affrontati, si è scelto di usare un anticorpo policlonale di coniglio.

3.5.a Anticorpo usato

L'Ab utilizzato presenta alta specificità per il fattore di rilascio della corticotropina con dominio C-terminale (*Anti-Corticotropin Releasing Factor-C-terminal ab231443*), si tratta di un Ab policlonale di coniuglio prodotto dalla ditta *Abcam*.

Esso reagisce sui tessuti umani (controllo positivo: tessuto cerebrale umano) ed ha una stimata reattività con i tessuti di cane (*datasheet* in PROTOCOLLI E ALLEGATI a pagina 93). La positività attesa era di tipo citoplasmatico e di secrezione.

3.5.b Determinazione dell'omologia

La ditta produttrice dell'Ag (*Abcam*), per gentile concessione, ha fornito l'esatta sequenza amminoacidica del peptide immunogeno così da poterla confrontare con quella del CRF canino riportata nel sito www.uniprot.org.

Quindi è stata eseguita un'analisi tramite *protein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* sul sito <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; questo programma consente il confronto tra sequenze amminoacidiche con funzione e struttura sconosciuta e sequenze (archivate nelle banche dati) la cui struttura e funzione sono note. L'esito del confronto ha confermato un'omologia del 100%.

3.5.c Prove di reattività e diluizioni

L'anticorpo è stato testato presso il laboratorio del servizio di Diagnostica Istopatologica del Dipartimento BCA dell'Università di Padova, relativamente all'area d'interesse, su un encefalo di primate non umano (*Non Human Primate, NHP*) e su un encefalo canino, alle diluizioni di 1:100, 1:200, 1:300.

Al termine della procedura, tali campioni sono stati valutati al microscopio ottico per la rilevazione della positività e, secondariamente, analizzati tramite scansione digitalizzata da un altro operatore presso l'Istituto di Scienze Veterinarie dell'Università di Liverpool.

La colorazione immunoistochimica, alla diluizione 1:100, è stata giudicata ottimale e non si è ritenuto necessario ricorrere all'uso né di un *blocking*, né di un *amplifier*.

Dopo la validazione dell'Ab, questo è stato applicato alla coorte di campioni selezionata, il vetrino di NHP è stato utilizzato come controllo positivo (campione con positività certa e ben evidente) (Fig.3.8) e come bianco (vetrino sul quale vengono distribuiti gli stessi reagenti degli altri campioni ad eccezione dell'Ag) per ogni corsa della macchina immunocoloratrice.

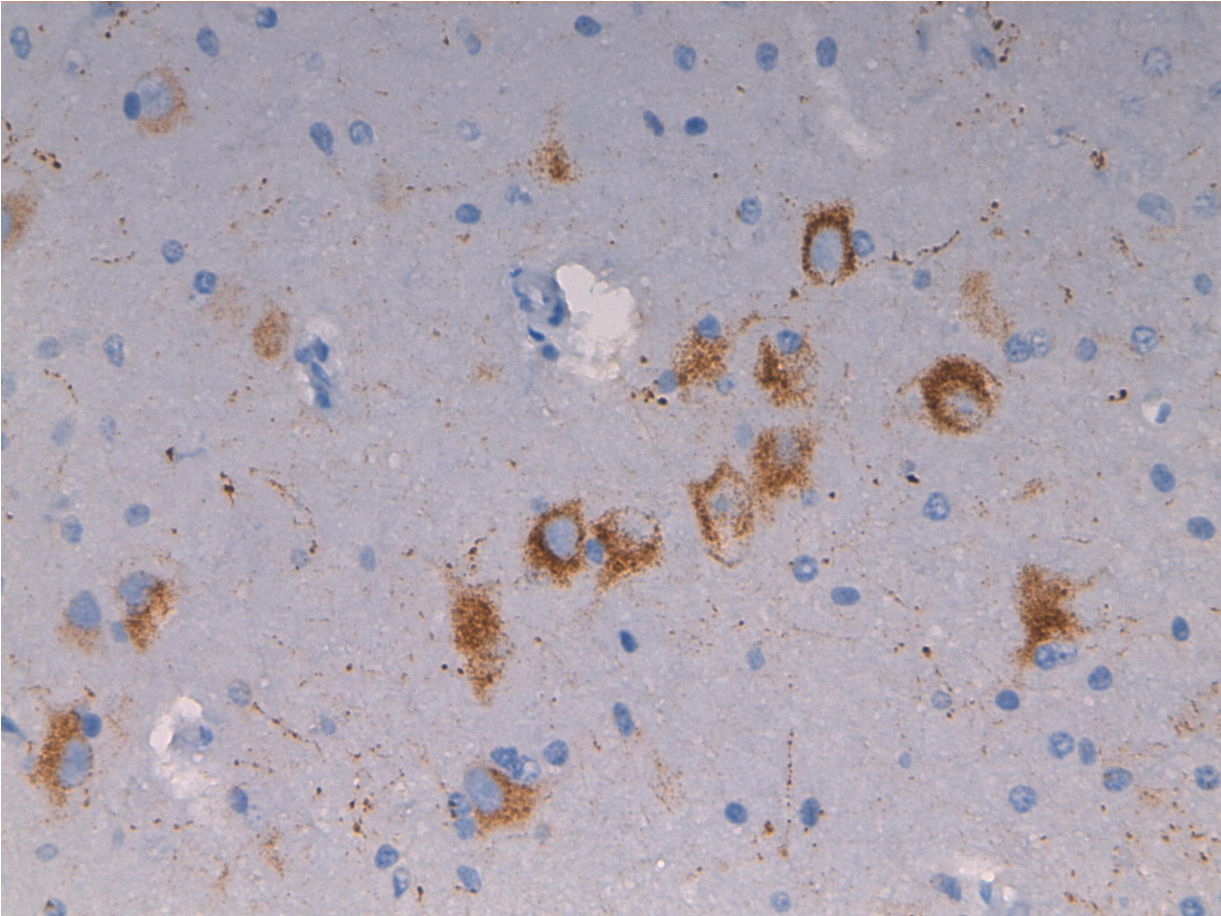


Fig.3.8 Dettaglio della scansione di vetrino contenente la sezione cerebrale (area paraventricolare ipotalamica) del campione di primate non umano (NHP) utilizzato come controllo positivo: le positività granulare citoplasmatica neuronale e neuropilare sono evidenti grazie alla colorazione marcatamente brunastra.

3.5.d Analisi immunoistochimica

L'IHC è stata realizzata con immunocoloratore automatico *Benchmark IHC/ISH (Ventana Medical System)* (Fig.3.10): esso permette di processare 20 vetrini contemporaneamente, i campioni pertanto sono stati suddivisi in due gruppi casuali.

3.5.e Sistema di rivelazione

Il sistema di rivelazione usato è *l'ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana)*, esso rileva Ab primari di topo di tipo IgG e IgM e di coniglio di tipo IgG. La reazione si basa sul legame tra l'Ab specifico e il

complesso Ab secondario- enzima marcato (Fig.3.9). In questo kit dunque l'enzima perossidasi (*Horse-radish- HRP*) è direttamente coniugato all'Ab secondario, in questo modo la sensibilità è maggiore e l'assenza di biotina minimizza la colorazione di fondo, eliminando l'azione della biotina endogena. La presenza dell'Ag specifico è infine resa visibile con l'aggiunta del substrato di perossido di idrogeno (H_2O_2) e il cromogeno DAB producendo un precipitato marrone intenso, resistente all'alcool e visibile al microscopio ottico (come indicato nel manuale Ventana: ultraView Universal DAB Detection Kit, 2011).

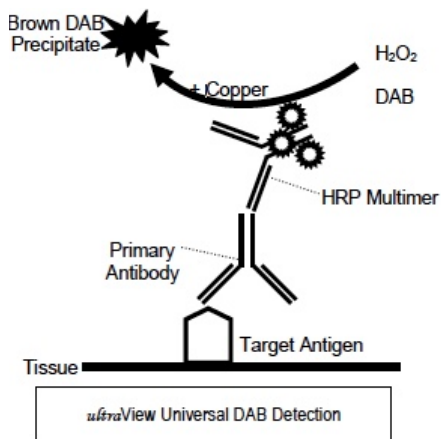


Fig.3.9 (Ventana, 2011)



Fig.3.10 (Ventana Medical Systems)
Benchmark Automatic Immunostainer

3.5.f Procedura immunoistochimica

Il protocollo di colorazione consiste in numerosi *step*, a tempi predeterminati e a specifiche temperature, di incubazione dei reagenti. Al termine di ogni *step* di incubazione l'immunocoloratore lava le singole sezioni per rimuovere il materiale che non si è legato e applica una *coverslip* liquida minimizzando l'evaporazione degli agenti dai vetrini.

Il colorante di contrasto usato è l'ematossilina.

Il protocollo completo è consultabile nella sezione finale "*PROTOCOLLI E ALLEGATI*" a pagina 95.

Al termine della procedura di IHC i vetrini sono stati lavati con acqua ed un agente tensioattivo per 3-4 volte, ciascuna di durata di 5 minuti, dopodiché sono stati disidratati per immersione in soluzioni di alcol a concentrazione crescente (50%, 70%, 90%, 100%) e infine xilene.

Al termine si è proceduto al montaggio del vetrino copri-oggetto tramite una goccia di apposito collante e all'asciugatura sotto cappa aspirante per una notte.

3.6 Acquisizione delle immagini

Dopo una prima osservazione al microscopio ottico, per verificarne l' idoneità qualitativa, i vetrini sono stati spediti all' Istituto di Scienze Veterinarie di Liverpool, dove sono stati scansati tramite scanner *Leica Aperio CS2* così da ottenere delle immagini digitali ad alta definizione in formato .svs.

La scansione dei vetrini è stata realizzata ad ingrandimento 40x con risoluzione finale di 113400x90648 *pixels* (Fig.3.11).

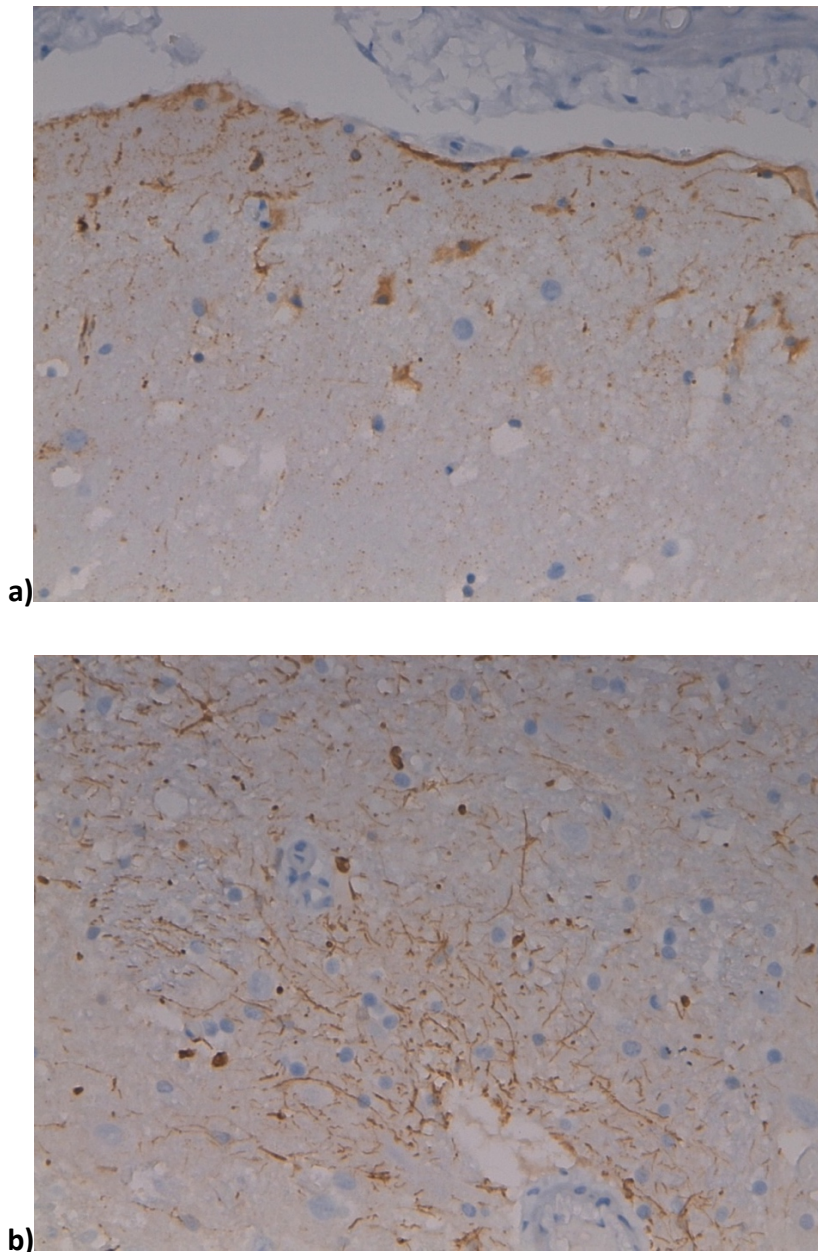


Fig.3.11 Dettaglio della scansione di vetrino contenente sezione cerebrale (area paraventricolare ipotalamica) del campione 14L-5116 (Img.a) e 1221 (Img.b): la positività granulare citoplasmatica e neuropilare è evidente grazie alla colorazione marcatamente brunastra.

3.7 Analisi delle immagini

Le immagini ottenute tramite scansione sono state analizzate con il *software d'analisi d'immagine Orbit* (www.orbit.bio). Si tratta di un programma *open source* che permette di automatizzare l'analisi d'immagine tramite l'esecuzione di vari algoritmi forniti da *Orbit* stesso, sostituendo quindi ciò che prima era appannaggio esclusivo del ricercatore (come la conta cellulare, l'identificazione degli specifici tipi cellulari, la quantificazione dei vari tipi tissutali immunocolorati) (Stritt, Giraud, & Lilaj, 2016). Attraverso questo software è lo scienziato stesso che insegna al programma come lavorare poiché esso è dotato di un sofisticato approccio d'apprendimento per la quantificazione WSI (*whole slide imaging*-visualizzazione dell'intero vetrino) e di flessibilità, ed è inoltre in grado di integrare un metodo di segmentazione di *deep learning* per il rilevamento di oggetti complessi (Stritt, Stalder, & Vezzali, 2019). Il *deep learning* è una branca dell'Intelligenza Artificiale costituita da algoritmi di apprendimento automatico ispirati alla struttura delle reti neurali artificiali: grazie ad esso è possibile simulare i processi di apprendimento dell'encefalo, così da insegnare alle macchine ad apprendere in maniera automatica e "profonda". Inoltre, affinché l'analisi si concentri in una porzione d'immagine specifica, è possibile definire una regione d'interesse (ROI- *Region of interest*). Gli algoritmi d'analisi d'immagine utilizzati, chiamati "modelli", includono il Modello di Esclusione, la Classificazione e la Segmentazione. Il Modello di Esclusione (*Exclusion Model*) permette al *software* di discriminare le porzioni della superficie scansionata che non appartengono al tessuto di interesse (in primo piano- *foreground*), ossia gli spazi vuoti (sfondo- *background*). Durante il nostro studio ciascuna valutazione di sezione tissutale è stata dunque anticipata dalla scelta di un modello appropriato di esclusione (Fig.3.12, 3.13 e 3.14).



Fig.3.12 Esempio di campionamento del tessuto da escludere (Stritt, Giraud, Lilaj, 2016).

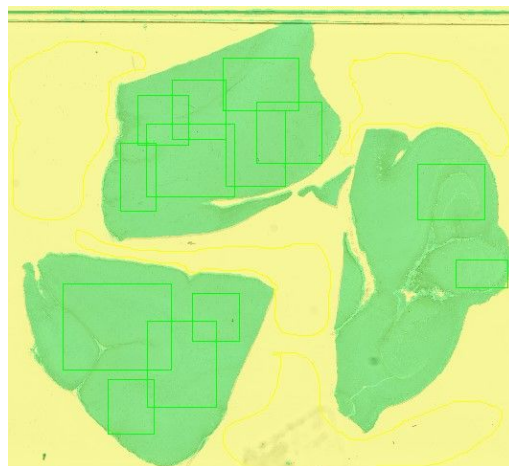


Fig.3.13 Modello della procedura di esclusione effettuata su sezioni cerebrali.

La porzione di tessuto selezionata nei rettangoli (*foreground*) è l'unica che verrà analizzata dai modelli di Classificazione e Segmentazione.

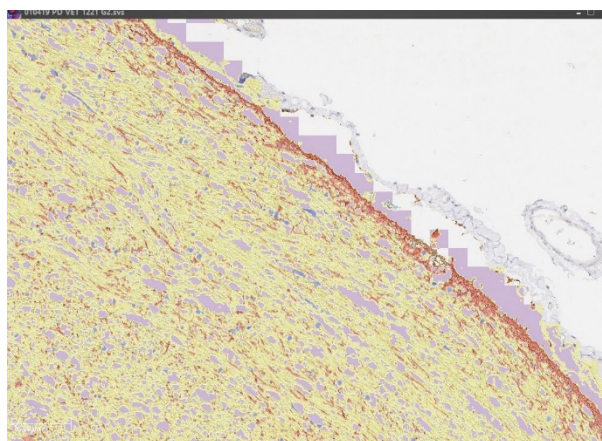


Fig.3.14 Modello di Esclusione su una porzione di vetrino appartenente allo studio.

La Classificazione (*Classification Model*) o Quantificazione del Tessuto permette invece di sapere se ogni singolo *pixel* di un'immagine è parte di una classe definita o di un'altra, questo è utile per esempio per verificare la presenza di un tessuto di un certo tipo o per classificare e quantificare una o più colorazioni all'interno del campione (Fig.3.15). Nello specifico, assoni positivi, nuclei, parenchima e minute porzioni di tessuto vuoto sono stati indicati come entità separate ed analizzate dalla macchina come percentuali sul totale della sezione encefalica. Come risultato finale della computazione, il *software* ha restituito un valore percentuale per ciascuna categoria sul totale della sezione encefalica.

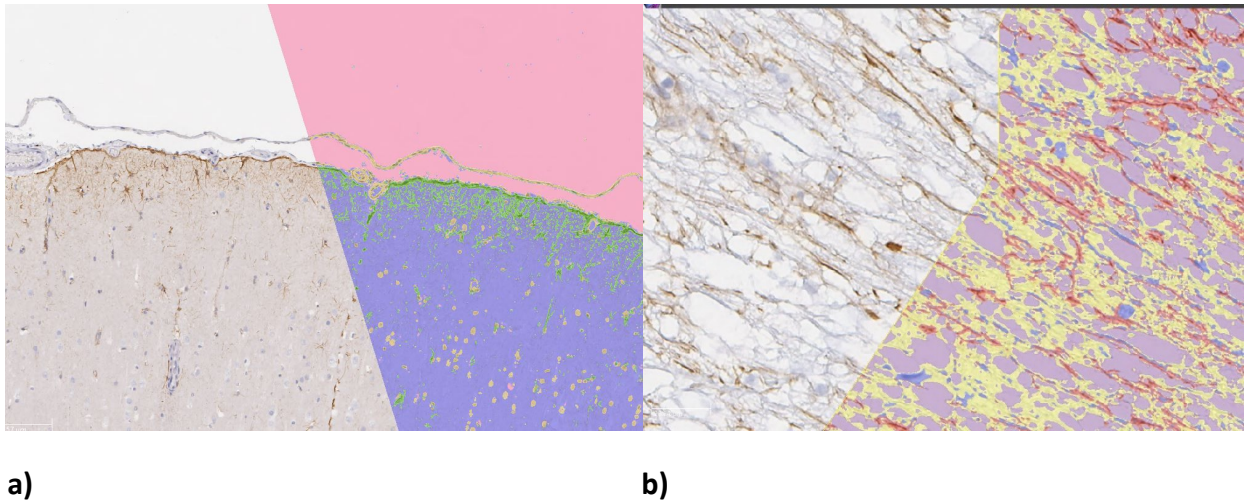


Fig.3.15 Dettaglio della procedura di Classificazione applicata ad un vetrino dello studio (a, b).

La Segmentazione dell'oggetto (*Object Segmentation Model*) permette di rilevare gli oggetti all'interno dell'immagine e descriverne la forma e il numero totale sulla sezione analizzata (*foreground, vedi Exclusion model*) (Fig.3.16). Tale modello permette inoltre di estrarre le principali caratteristiche degli oggetti rilevati (ad esempio l'area, il colore o parametri più complessi come la rotondità) che possono essere poi facilmente analizzate attraverso l'indagine statistica (Stritt, Giraud, Lilaj, 2016). Alla conclusione della computazione, il modello di segmentazione genera un numero assoluto che rappresenta il totale di oggetti discreti identificati entro la ROI che, nel nostro caso, è stata arbitrariamente centrata sul talamo e delineata da un quadrato di 30000 *pixel* di dimensione, equivalente a 604,8 μm , con un'area complessiva di 365783 μm^2 (Fig.3.17 e 3.18).

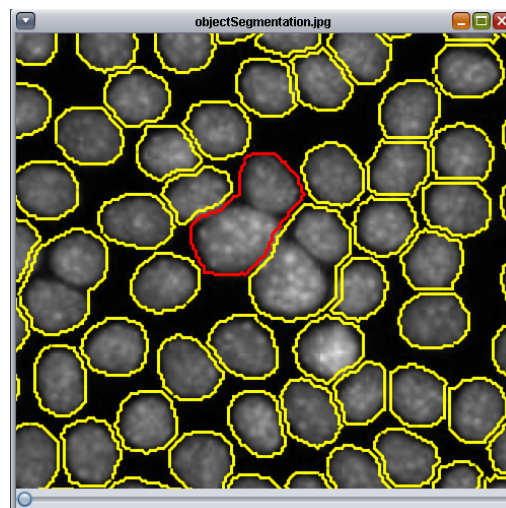


Fig.3.16 Esempio della procedura di Segmentazione: le cellule identificate sono evidenziate da una linea gialla, l'oggetto circondato dalla linea rossa è stato selezionato (Stritt, Giraud, Lilaj, 2016).

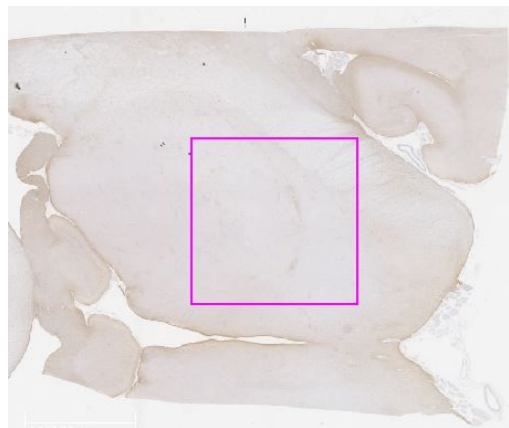


Fig.3.17 Selezione della ROI da sottoporre a procedura di Segmentazione in un vetrino appartenente allo studio.

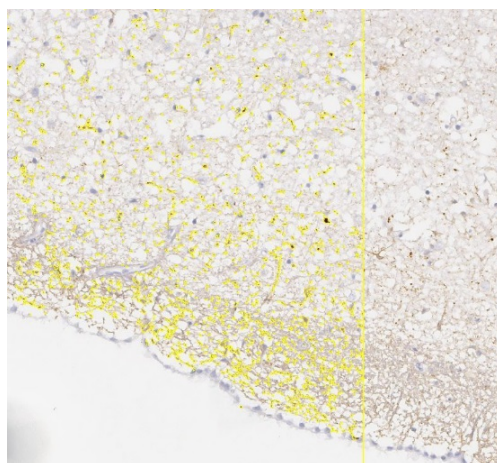


Fig.3.18 Procedura di Segmentazione eseguita su una ROI.

3.8 Analisi statistica

I dati ottenuti mediante l'utilizzo del *software Orbit* sono stati sottoposti ad analisi statistica tramite l'utilizzo del *software MedCalc* (© 2020 MedCalc Software Ltd). I risultati sono stati quindi oggetto di analisi descrittiva tramite elaborazione di un istogramma, così da identificarne il tipo di distribuzione statistica.

Come si evince dall'osservazione dei grafici sottostanti i dati da noi ottenuti presentano una distribuzione di tipo non normale (Fig.3.19 e 3.20). Tale analisi preliminare è stata indispensabile per la scelta del tipo di analisi statistica da applicare alla coorte.

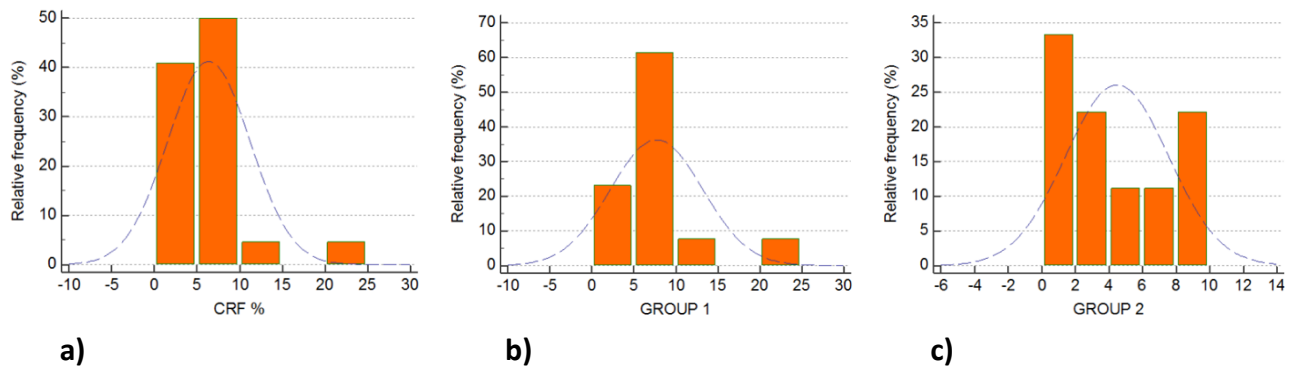


Fig.3.19 Distribuzione di frequenza dei dati ottenuti mediante la procedura di Classificazione:

a) gruppo 1+gruppo 2, b) gruppo 1, c) gruppo 2. Ad una prima analisi visiva i dati in a) e b), a differenza del gruppo 2, non seguono una distribuzione normale. Ai fini dello studio quindi considereremo entrambi i gruppi, 1 e 2, caratterizzati da una distribuzione dei dati non normale.

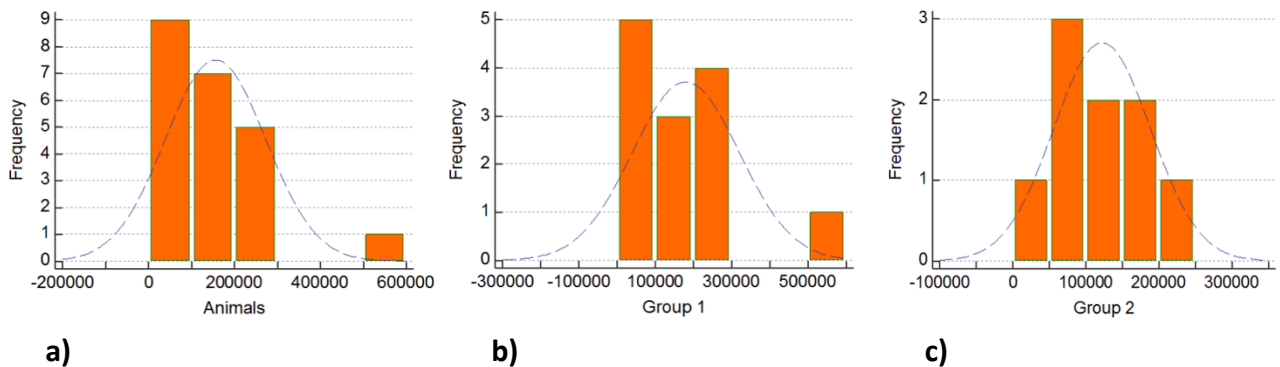


Fig.3.20 Distribuzione di frequenza dei dati ottenuti mediante la procedura di Segmentazione:

a) gruppo 1+gruppo 2, b) gruppo 1, c) gruppo 2. Ad una prima analisi visiva i dati in a) e b), a differenza del gruppo 2, non seguono una distribuzione normale. Ai fini dello studio quindi considereremo entrambi i gruppi, 1 e 2, caratterizzati da una distribuzione dei dati non normale.

Il confronto tra i soggetti appartenenti al gruppo 1 (animali morti in seguito ad un lungo periodo di malnutrizione) ed i soggetti del gruppo 2 (animali morti in seguito ad un periodo agonico di durata inferiore alle 72 ore) è stato quindi realizzato mediante il test non parametrico di Mann-Whitney (utilizzato poiché la distribuzione dei campioni in esame non è normale).

Esso è stato utilizzato per valutare sia i dati ottenuti mediante la procedura di Segmentazione sia i quelli derivanti dalla procedura di Classificazione.

Attraverso tale test è possibile verificare se due gruppi indipendenti appartengono o meno alla medesima popolazione e dunque, in riferimento a questo studio, accettare o rifiutare l'ipotesi nulla (H_0) che non vi sia una differenza statisticamente significativa tra i valori di CRF ipotalamici tra gruppo 1 e gruppo 2. Nel caso di rifiuto dell'ipotesi nulla, ovvero nel caso in cui venga rivelata una differenza tra gruppo 1 e gruppo 2 che sia statisticamente significativa, è poi possibile utilizzare una curva ROC così da identificare il valore soglia che discrimini tra le due popolazioni, con relativi valori di Sensibilità e Specificità.

Attraverso il test di Mann-Whitney si è scelto inoltre di comparare, all'interno dei gruppi 1 e 2, la concentrazione di CRF ipotalamico ottenuta con la procedura di Classificazione, relativamente ai caratteri di genere (maschio/femmina) e a quelli concernenti l'età (cucciolo/giovane adulto e adulto/anziano).

A fini statistici si è scelto di considerare significativo il valore di $P \leq 0.05$.

4 RISULTATI

4.1 Scelta dei campioni

Dei 140 campioni selezionati in partenza ne sono stati scelti 22 sulla base delle informazioni caso specifiche disponibili, dello stato di conservazione dei vetrini, dell'area cerebrale campionata (purtroppo non sempre rispondente a quella di interesse) e dello stato dell'organo al momento del campionamento (esclusione del tessuto cerebrale scongelato).

Sono stati a priori eliminati i campioni nel cui *report* fossero descritti artefatti istologici autolitici (l'esame istologico deve essere sempre eseguito anche in presenza di materiale decomposto) o patologie ad interessamento cerebrale.

Le caratteristiche generali dei soggetti appartenenti ai gruppi 1 e 2 confrontati nello studio sono consultabili nella TABELLA 4.1.

Le cause di morte indagate, in base alle indicazioni contenute nell'ICD-10 *Cause-of-Death Lists for Tabulating Mortality Statistics* (Anderson et al., 2003), sono state (TABELLA 4.2):

- malnutrizione (13 casi);
- trauma cranico (5 casi);
- accoltellamento (3 casi);
- colpo d'arma da fuoco (1 caso).

Meccanismi di morte riscontrati:

- arresto cardiaco/insufficienza cardio-respiratoria;
- lesione cerebrale;
- shock ipovolemico/emorragia.

In nessun caso le modalità di morte sono risultate accidentali, 14 di esse sono avvenute per negligenza, 8 per traumi di tipo meccanico e 1 in seguito a colpi d'arma da fuoco.

I casi sono quindi stati suddivisi in due gruppi in relazione alla durata del periodo agonico; i soggetti appartenenti al gruppo 1 (13 casi) sono caratterizzati da un lungo periodo agonico associato a morte per malnutrizione, i soggetti del gruppo 2 (9 casi) invece sono associati a un periodo agonico di durata nulla, breve o media come conseguenza di diverse cause di morte (TABELLA 4.3).

TABELLA 4.1

GRUPPO	ID CASO	SESSO	ETA'	RAZZA	PESO (KG)
1	15L-1238	M	giovane adulto	Staffordshire bull terrier	9,2 kg
1	15-1754	M	adulto	simil Staffordshire bull terrier	26 kg
1	2361	F	giovane adulto	simil Barboncino	1.3 kg
1	12L-4937	F	NR (presumibilmente adulto)	Staffordshire bull terrier	9,45 kg
1	15L-0903	M	adulto	Boxer	17 kg
1	15-2759	M	giovane adulto	Bull Terrier	11 kg
1	16L-0592	M	adulto	meticcio	14,8 kg
1	17L-0567	M	adulto	Rottweiler	19 kg
1	15L-5702	M	giovane adulto	Staffordshire bull terrier	14,8 kg
1	15L-0419	M	giovane adulto	Staffordshire bull terrier	11 kg
1	17L-2188	M	adulto	Staffordshire bull terrier	10,9 kg
1	15L-5495	M	adulto	Staffordshire bull terrier	7,6 kg
1	14L-5116	F	cucciolo	Springer Type	4 kg
2	15L-5849	F	giovane adulto	Cavalier king charles Spaniel	4,9 kg
2	17L-3199	M	cucciolo	Shit Tzu dog	2,4 kg
2	17L-2661	F/N	giovane adulto	Jack Russel Terrier	4,3 kg
2	1221	M	anziano	Dogue de Bordeaux	38 kg
2	13L-0472	M	adulto	simil Pit Bull	25 kg
2	16L-4651	M	adulto	American Bull Dog	41 kg
2	16L-4080	M/N	adulto	simil Black terrier	buon BCS (45-68 SdR)
2	16L-5043	M	adulto	Staffordshire bull terrier	19,5 kg
2	14L-3746	F/N	anziano	Jack Russel Terrier	5,4 kg

Legenda: N (*neutered/sterilizzato*); NR non riportata; SdR secondo lo standard di razza.

Nella TABELLA 4.1 sono elencati sesso, età, razza e peso in chilogrammi dei soggetti appartenenti ai due gruppi in esame, ciascuno identificato con il proprio *ID*.

TABELLA 4.2

GRUPPO	ID CASO	CAUSA DI MORTE	MODALITA' DI MORTE (non accidentale)	MECANISMO DI MORTE
1	15L-1754	malnutrizione	negligenza	malnutrizione primaria
1	15L-1238	malnutrizione	negligenza	malnutrizione primaria
1	2361	malnutrizione	negligenza	malnutrizione primaria
1	12L-4937	malnutrizione	negligenza	insufficienza C/R
1	15L-0903	malnutrizione	negligenza	malnutrizione primaria
1	15-2759	malnutrizione	negligenza	arresto cardiaco
1	16L-0592	malnutrizione	negligenza	malnutrizione primaria
1	17L-0567	malnutrizione	negligenza	insufficienza C/R
1	15L-5702	malnutrizione	negligenza	malnutrizione primaria
1	15L-0419	malnutrizione	negligenza	malnutrizione primaria
1	17L-2188	malnutrizione	negligenza	insufficienza C/R
1	15L-5495	malnutrizione	negligenza	squilibrio elettrolitico
1	14L-5116	malnutrizione	negligenza	insufficienza C/R
2	15L-5849	trauma cranico	lesione meccanica	insufficienza C/R
2	17L-3199	trauma cranico	lesione meccanica	insufficienza C/R
2	17L-2661	trauma cranico	lesione meccanica	lesione cerebrale
2	1221	colpo d'arma da fuoco	lesione meccanica	shock ipovolemico
2	13L-0472	accoltellamento	lesione meccanica	shock ipovolemico
2	16L-4651	accoltellamento	lesione meccanica	shock ipovolemico
2	16L-4080	accoltellamento	lesione meccanica	shock ipovolemico
2	16L-5043	trauma cranico	lesione meccanica	lesione cerebrale
2	14L-3746	trauma cranico	lesione meccanica	lesione cerebrale

Legenda: insufficienza C/R (insufficienza cardio-respiratoria).

Nella TABELLA 4.2 sono descritte causa, modalità e meccanismo di morte dei soggetti appartenenti ai due gruppi in esame, ciascuno identificato con il proprio *ID*.

TABELLA 4.3

GRUPPO	CASO	DURATA DELL'AGONIA (nota o presunta)	INTERVALLO POST MORTEM
1	15L-1238	lunga	lungo
1	15-1754	lunga	lungo
1	2361	lunga	medio
1	12L-4937	lunga	medio
1	15L-0903	lunga	medio
1	15-2759	lunga	medio
1	16L-0592	lunga	medio
1	17L-0567	lunga	medio
1	15L-5702	lunga	medio
1	15L-0419	lunga	corto
1	17L-2188	SdR	da corto a medio
1	15L-5495	SdR	medio
1	14L-5116	SdR	corto
2	15L-5849	media	medio
2	17L-3199	media	medio
2	17L-2661	breve	medio
2	1221	breve	medio
2	13L-0472	media	medio
2	16L-4651	immediata	medio
2	16L-4080	immediata	lungo
2	16L-5043	immediata	lungo
2	14L-3746	immediata	lungo

Legenda: sindrome da rialimentazione (SdR).

Nella TABELLA 4.3 sono descritti la durata del periodo agonico e l'intervallo *post mortem* Intercorso tra la morte stessa e l'esecuzione della necropsia dei soggetti appartenenti ai due gruppi in esame, ciascuno identificato con il proprio ID.

4.2 Analisi statistica

Tramite la Classificazione di *Orbit* è stata ottenuta la concentrazione di CRF nell'area di interesse nei diversi campioni in esame (TABELLA 4.4).

TABELLA 4.4

ID	GRUPPO	CRF %
14L-3746	2	1,1811
16L-4080	2	2,9405
17L-2661	2	7,2919
1221	2	8,9124
15L-5849	2	8,6034
16L-4651	2	3,7121
16L-5043	2	4,515
17L-3199	2	1,8732
13L-0472	2	1,3691
2361	1	3,9867
12L-4937	1	6,7123
15L-0903	1	10,4183
15L-1238	1	9,0266
15L-1754	1	24,4141
15L-2759	1	8,8384
15L-5495	1	8,0849
16L-0592	1	5,3227
17L-0567	1	5,0298
17L-2188	1	5,9969
15L-0419	1	2,8678
14L-5116	1	4,4582
15L-5702	1	5,0305

Nella TABELLA 4.4 sono riportati, per ciascun caso, i valori percentuali di CRF ottenuti tramite la Classificazione del software *Orbit*.

Attraverso la procedura di Segmentazione è stata analizzata la regione del diencefalo, scelta da noi come ROI.

Nella tabella sottostante (TABELLA 4.5) è riportato, per ciascun caso, il numero assoluto che rappresenta il totale di oggetti discreti, ossia di neuroni (pirenoforo, assone e dendriti) positivi alla colorazione, identificati entro il diencefalo.

TABELLA 4.5

CASI	GRUPPO 1	OGGETTI
15L-1754	1	544283
12L-4937	1	150824
14L5116 h	1	65827
15L-0419	1	59022
15L-0903	1	291778
15L-1238	1	110139
15L-2759	1	216235
15L-5495	1	264165
15L-5702	1	54188
16L-0592	1	265828
17L-0567	1	99575
17L-2188	1	169404
2361	1	46887
14L-3746	2	181539
16L-4080	2	60321
17L-2661	2	114670
1221	2	115600
15L-5849	2	230830
16L-4651	2	197144
16L-5043	2	82214
17L-3199	2	40307

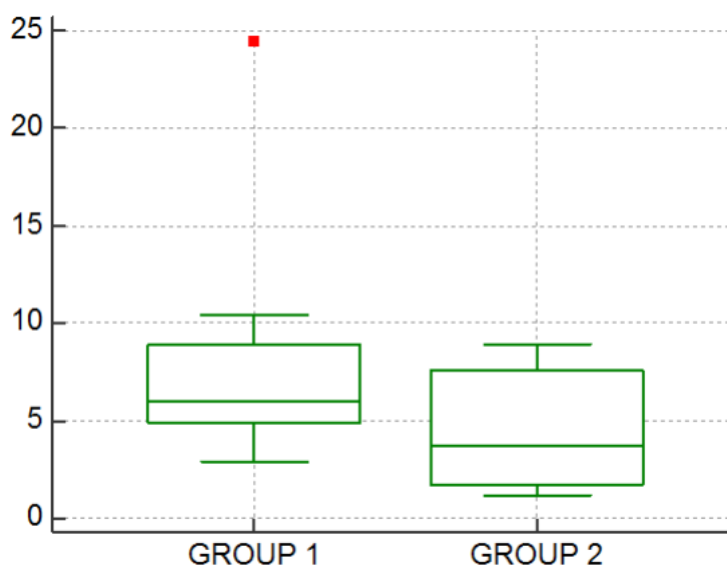
Nella TABELLA 4.5 è riportato, per ciascun caso, il valore assoluto di oggetti discreti identificati nella ROI.

4.2.a Risultati ottenuti con il test di Mann-Whitney

4.2.a.1 Mann-Whitney applicato ai dati di Classificazione

Nelle figure sottostanti (Fig.4.1) sono riportati i dati ottenuti dall'analisi dei valori derivanti dalla procedura di Classificazione: le mediane della concentrazione di CRF del gruppo 1 e 2 sono rispettivamente 5,9 e 3,7 mentre il p-Value è 0,0768.

La differenza tra le concentrazioni del marker in esame nei due gruppi di soggetti non si è dunque dimostrata statisticamente significativa ($P > 0,05$).



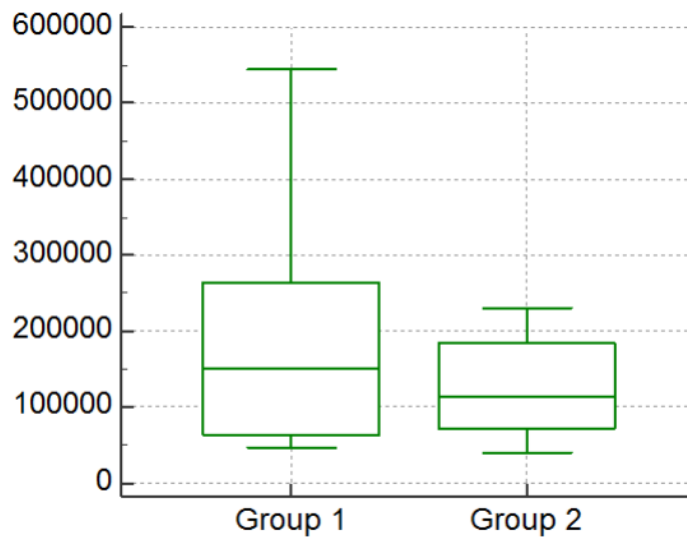
	Gruppo 1	Gruppo 2
N° campioni	13	9
Valore più basso	2,86	1,18
Valore più alto	24,41	8,91
Mediana	5,99	3,71
95% IC per la mediana	4,76 a 8,92	1,43 a 8,42
Range interquartile	4,88 a 8,88	1,74 a 7,61
Test Mann-Whitney		
Range medio Gruppo 1	13,53	
Range medio Gruppo 2	8,55	
Mann-Whitney U	32	
Test statistico Z	1,77	
Test probabilità a 2 code	P = 0,07	

Legenda: IC intervallo di confidenza; N° numero
 Fig.4.1 Box plot che descrive la rappresentazione visiva della distribuzione dei risultati, ottenuti dalla comparazione dei valori di CRF tra gruppo 1 e gruppo 2 ottenuti con la Classificazione di *Orbit*, attraverso l'analisi di Mann-Whitney. Il quadratino rosso rappresenta un valore che si discosta molto dalla media degli altri soggetti appartenenti al gruppo 1.

4.2.a.2 Mann-Whitney applicato ai dati di Segmentazione

I dati ottenuti tramite l'analisi del software *Orbit*, come precedentemente descritto, sono stati valutati tramite il test non parametrico di Mann-Whitney.

Nelle figure sottostanti (Fig.4.2) sono riportati i dati ottenuti dall'analisi dei valori derivanti dalla procedura di Segmentazione: le mediane della concentrazione di CRF del gruppo 1 e 2 sono rispettivamente 150824 e 114670 mentre il p-Value è 0,4832. Anche in questo caso la differenza tra i due gruppi non si rivela statisticamente significativa.



	Gruppo 1	Gruppo 2
N° campioni	13	9
Valore più basso	46887	40307
Valore più alto	544283	230830
Mediana	150824	114670
95% IC per la mediana	62638,88 a 264944,10	62585,46 a 194990,88
Range interquartile	64125,75 a 264580,75	72630 a 185440,25
Test di Mann-Whitney		
Range medio Gruppo 1	12,30	
Range medio Gruppo 2	10,33	
Mann-Whitney U	48	
Test statistico Z	0,70	
Test probabilità a 2 code	P=0,48	

Legenda: IC intervallo di confidenza; N° numero.

Fig.4.2 Box plot che descrive la rappresentazione visiva della distribuzione dei risultati, ottenuti dalla comparazione dei valori di CRF tra gruppo 1 e gruppo 2 ottenuti con la Segmentazione di *Orbit*, attraverso l'analisi di Mann-Whitney.

4.2.b Analisi dei sottogruppi

All'interno dei gruppi 1 e 2, attraverso il test di Mann-Whitney, sono stati comparati, in termini di espressione di CRF ipotalamico, anche i parametri relativi al sesso (maschio/femmina) e quelli concernenti l'età (cucciolo-giovane adulto e adulto-anziano) (Fig.4.3 e 4.4).

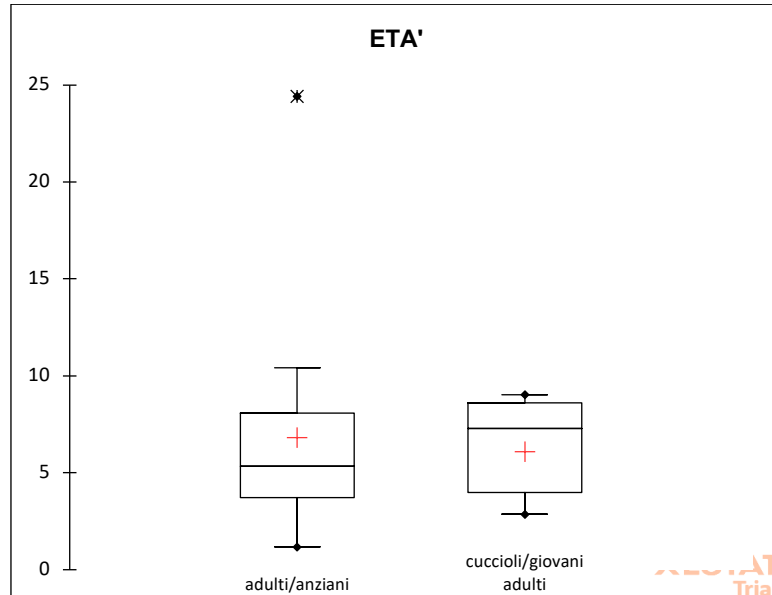


Fig.4.3 Boxplot di comparazione tra le concentrazioni di CRF% ipotalamico nei soggetti adulti/anziani e nei cuccioli/giovani adulti.

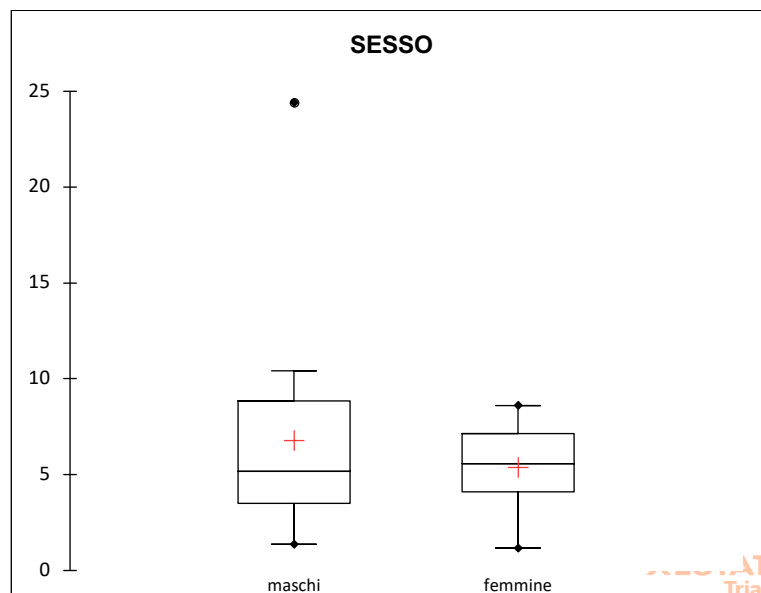


Fig.4.4 Boxplot di comparazione tra le concentrazioni di CRF% ipotalamico nei soggetti di sesso maschile e in quelli di sesso femminile.

Come si può evincere dall'analisi dei grafici soprastanti H_0 non è stata smentita (p-Value rispettivamente di 0,907 e di 0,641) e non vi è dunque apparente differenza nell'espressione del CRF a livello del PVN ipotalamico in queste due sottocategorie.

4.2.c Analisi della curva ROC

Sulla base dei risultati ottenuti tramite il test di Mann-Whitney e sui dati derivanti dalla Classificazione di *Orbit*, il Gruppo 1 e il Gruppo 2 sono risultati statisticamente uguali.

Abbiamo comunque deciso di eseguire, a scopo simulativo, l'analisi della curva ROC (Fig.4.5). Attraverso questa procedura è possibile stabilire l'accuratezza di un test diagnostico, ossia la sua capacità di identificare come positivi i soggetti che realmente lo sono (Sensibilità) e di identificare come negativi i soggetti che sono effettivamente negativi (Specificità).

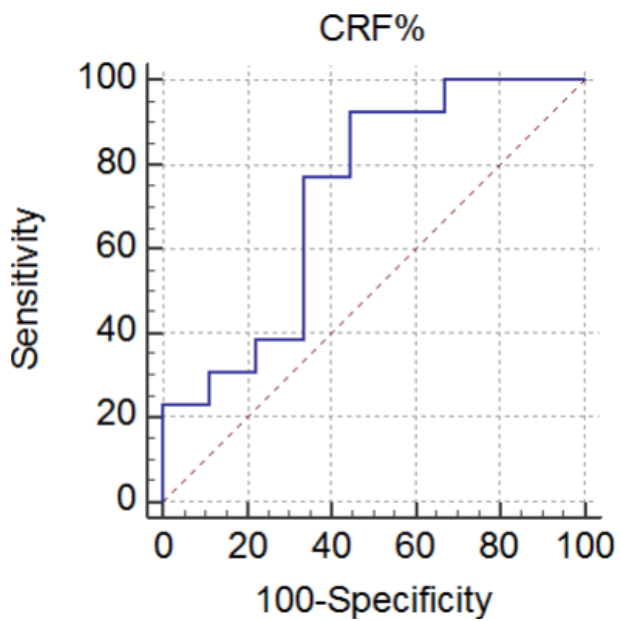
Tramite l'utilizzo di quest'analisi è possibile individuare un valore soglia (*cutoff*) che permette la discriminazione tra soggetti "positivi" e "negativi" al quale segue la comparazione tra la Sensibilità e il Tasso di Incidenza dei Falsi Positivi (FPR- *False Positive Rate*).

La curva ROC genera un'area sotto la curva (AUC-*Area Under Curve*) la cui analisi permette di stabilire il valore discriminante del test diagnostico.

Se la curva ROC, ad esempio, corrisponde ad una diagonale (*Chance Diagonal*, coordinate 0;0 e 1;1) il valore predittivo del test diagnostico non sarà migliore di quello conseguente al puro caso. Viceversa valori compresi tra 0,5 e 1 indicano un test diagnostico in grado di discriminare i "positivi" dai "negativi" in maniera efficace (Hajian-Tilaki, 2013).

La Sensibilità e la Specificità del valore di *cutoff* (in questo caso pari a >3,7%) sono, in quest'analisi, rispettivamente del 92,31 % e del 55,56% ed il valore di AUC è 0,726 (tabella sottostante).

Poiché $0,7 < AUC < 0,9$ potremmo ipoteticamente affermare che il test sarebbe da considerarsi "moderatamente accurato" (D'Arrigo et al., 2011).



Variabile	CRF%
Classificazione della variabile	gruppo
Dimensione campione	22
Gruppo positivo a	13 (59,09%)
Gruppo negativo b	9 (40,91%)
Gruppo a	1
Gruppo b	0
AUC	0,72
Errore standard a	0,12
95% IC b	0,49 a 0,89
Statistica z	1,86
Livello significatività P (Area=0.5)	0,06
Sensibilità	92,31
Specificità	55,56

Fig.4.5 Grafico della curva ROC, relativa alla concentrazione del CRF nei due gruppi in esame, in cui sull'asse delle ordinate è posta la Sensibilità e su quello delle ascisse il numero di falsi positivi (1-Specificità); l'andamento della curva rappresenta il numero di veri-positivi (Sensibilità) rispetto ai falsi positivi per ognuno dei valori di riferimento.

5. DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio consisteva nell'indagare i diversi livelli di espressione del CRF, a livello dei PVN ipotalamici, in modo da approfondire la sua relazione con la durata dell'agonia *pre-mortem*. L'ipotesi alla base dell'indagine, ovvero che uno stress di lunga durata possa essere correlato ad una maggior espressione di CRF a livello cerebrale, mentre uno stress di breve durata non altererebbe l'espressione della proteina qui oggetto di studio (per lo meno non agli stessi livelli), rappresenta un'importante possibilità diagnostica per la Medicina Forense. Ciò getterebbe le basi per la differenziazione, in sede necroscopica, del tipo di stress, finanche di abuso, subito dall'animale.

Per quanto riguarda il reclutamento, è importante sottolineare che i casi in esame sono stati selezionati da una coorte molto ampia sulla base di criteri stabiliti a priori, al fine di garantire robustezza allo studio. Non essendo disponibili in letteratura studi analoghi sull'indagine di CRF da utilizzare come modello, i criteri scelti sono stati rigidi ed hanno, purtroppo, ridotto di molto la coorte di campioni utile allo studio. Grazie alle tecniche di immunoistochimica nonché all'uso di uno specifico Ab e, in seguito, alle tecniche di *imaging*, è stato tuttavia possibile evidenziare la concentrazione citoplasmatica e secretoria del CRF nei neuroni dei PVN ipotalamici.

Tale concentrazione è stata quantificata e studiata nella sua distribuzione attraverso uno specifico *software* (*Orbit*), in particolare la tecnica d'analisi d'immagine rivelatasi più efficiente è stata la Classificazione. Tale algoritmo infatti, analizzando i *pixel*, quantifica una o più colorazioni all'interno del campione classificando con precisione le aree risultate positive alla colorazione immunoistochimica.

Al contrario la Segmentazione, che lavora analizzando le forme, poco si presta a categorizzare la variabilità della forma neuronale, come ad esempio quella dell'arborescenza dendritica, pur essendo anche questa positiva all'immunoistochimica.

I dati così ottenuti sono stati sottoposti ad indagine statistica. Quest'ultima non ha smentito H₀ ossia l'ipotesi che pone come assunto l'assenza di una differenza statisticamente significativa tra i valori di CRF ipotalamici tra gruppo 1 e gruppo 2.

Pertanto non si può affermare che vi sia diversità rilevante tra la concentrazione di CRF nei PVN ipotalamici dei cani deceduti in seguito a malnutrizione e, quindi, ad una lunga agonia (gruppo 1) e quelli, invece, le cui morti sono state di durata medio-rapida e dunque associate ad agonia di breve durata (gruppo 2). Tuttavia è importante sottolineare che il p-Value risultante dal test di Mann-Whitney, applicato ai dati della Classificazione, è risultato essere di 0,0768, valore di poco superiore a quello considerato significativo, ovvero $P \leq 0.05$.

La direzione appare quindi essere quella giusta, ed è probabile che un ampliamento della numerosità campionaria porterà ad un miglioramento del *trend* statistico.

Osservando la Fig.4.1 nella sezione RISULTATI, si può comunque apprezzare come una differenza tra i due gruppi sia otticamente visibile e non si può dunque negare l'evidenza di un *trend* che lascia ben sperare riguardo futuri approfondimenti.

La media di positività al CRF del gruppo 1 è infatti superiore del 18,8% rispetto al gruppo 2, dunque una differenza, tra la quantità di CRF rilevata nei casi del gruppo 1 e in quelli del gruppo 2, esiste.

Solo ulteriori studi potranno tuttavia affermare se tale *trend* sia dovuto al caso o meno. Qualora in futuro si evidenziasse una differenza statisticamente significativa nei livelli di CRF ipotalamico, in base ai livelli di stress subito dalla vittima animale, il Medico Veterinario Patologo Forense potrebbe infatti avvalersi di un utile strumento di valutazione e di incriminazione nei casi di abuso.

Di seguito, alla luce dei risultati ottenuti, vengono riportate alcune considerazioni aggiuntive in merito alla questione indagata.

In primis è importante sottolineare come, attraverso questo studio, sia stato possibile effettuare una prima e nuova validazione dell'Ab *ab231443* della ditta *Abcam* sul tessuto cerebrale di specie diverse (cane, NHP). Questo Ab, sintetizzato per reagire con il CRF di origine umana, ha dimostrato infatti un'ottima *cross* reattività ed un'alta specificità anche nei primati non umani (utilizzati come controllo) e nella specie canina. L'ottima resa, con un segnale di colorazione intenso e preciso, privo di colore di fondo, si è rivelata inoltre ideale per l'utilizzo del software di analisi d'immagine. L'alta definizione del segnale infatti limita ed elimina il rischio per il *software* di interpretare colorazioni di fondo o aspecifiche come un reale segnale positivo, andando a sovrastimare l'effettiva positività del campione e quindi falsando l'indagine.

Secondariamente, è stato possibile verificare l'utilità e la precisione di uno studio di tipo automatizzato. Si tratta infatti di procedure facilmente replicabili nelle quali il fattore di variabilità legato all'occhio umano, che spesso subisce una notevole variazione legata sia all'operatore sia alla scelta (purtroppo necessaria a priori) dei campi da analizzare, è eliminato. Attraverso l'analisi d'immagine computerizzata, è infatti possibile analizzare il vetrino nella sua interezza senza limitarsi all'osservazione di un numero predeterminato di campi.

5.1 Analisi dei sottogruppi

Dall'analisi dei sottogruppi risulta che i livelli di CRF nei campioni di sesso femminile e in quelli di sesso maschile subiscono variazioni non influenzate dal genere e che lo stesso valga per il "fattore età" nei cuccioli, nei giovani adulti, negli adulti e negli anziani. Va detto tuttavia che il numero di soggetti di sesso femminile analizzati è nettamente inferiore rispetto a quelli di sesso maschile, rispettivamente il

rapporto è di 6 a 16; il rapporto tra i soggetti appartenenti alle categorie cucciolo/giovane e adulto e adulto/anziano è invece di 9 a 13.

Se tale evidenza dovesse essere confermata da studi su coorti più numerose e per classi omogenee, si potrebbe evincere l'utilità della valutazione del CRF come *cut-off* applicabile ad ogni classe, senza distinzioni di sesso ed età. A tale scopo, ad esempio, sarebbe utile confrontare tra loro i valori di CRF ipotalamico presenti nei casi di sesso maschile con quelli relativi ai casi di sesso femminile, rispettivamente appartenenti al Gruppo 1 (morti conseguenti ad una lunga agonia) e al Gruppo 2 (morti rapide associate ad un breve periodo agonico).

Analogo ragionamento vale anche in riferimento al tipo di età dei diversi soggetti. Campioni più equilibrati e numerosi potrebbero dunque confermare con maggior evidenza questo *trend* (uniformità nel variare della concentrazione del CRF ipotalamico in maschi e femmine) apportando maggior precisione all'indagine con il *marker* in esame.

5.2 Limiti

I campioni analizzati sono stati in totale 22, con un numero di tale portata non è stato quindi possibile dare la giusta rappresentatività alle varie categorie e sottocategorie (TABELLE 4.1, 4.2 e 4.3 nella sezione RISULTATI) caratterizzanti i soggetti in esame.

Per cause di forza maggiore, i casi appartenenti al gruppo 1 (13 casi) sono in netta maggioranza rispetto a quelli del gruppo 2 (9 casi). Reperire cani sani e deceduti in seguito ad eventi acuti o iperacuti e sottoposti, infine, a necropsia risulta infatti non sempre facile.

Inoltre, per quanto riguarda l'encefalo, non c'è un metodo di campionamento standardizzato e la zona d'interesse nei casi archiviati selezionati talvolta si è rivelata inadatta allo studio.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I dati estrapolati da questo studio si pongono ad un livello *borderline* lasciando presagire che, implementando il quantitativo dei campioni in esame, l'analisi si rivelerebbe senza dubbio più precisa e attendibile portando a nuovi e interessanti sviluppi.

Visti i risultati estremamente promettenti dell'uso del CRF come *marker*, sarà dunque interessante in futuro ripetere l'intera analisi su un ventaglio molto più ampio di campioni, incrementando soprattutto il numero di soggetti del gruppo 2, attraverso la selezione di soggetti morti rapidamente in seguito ad eventi traumatici acuti o iperacuti. A tale scopo sarebbe senz'altro utile adottare una procedura di campionamento *target* per quanto riguarda il prelievo dell'encefalo in corso di necropsia.

Nel frattempo crediamo che questo lavoro possa essere di ispirazione e possa porre le basi per ulteriori studi alla ricerca di *marker* che permettano al Medico Veterinario Patologo di stabilire con maggiore precisione le circostanze fisiche, ma soprattutto emotive, della morte della vittima animale così da poter perseguire il/i responsabile/i in accordo con la legge vigente.

Justitia suum cuique distribuit

La giustizia dà a ciascuno il suo

(Marco Tullio Cicerone)

7. ALLEGATI E PROTOCOLLI

7.1 Fascicolo fotografico (facente parte integrante di un report di valenza legale) di una necropsia eseguita presso il dipartimento di Patologia Veterinaria dell'Istituto di Scienze Veterinarie di Liverpool:



Veterinary Laboratory Services
Case No.: 16L-4080
RSPCA Incident Num [REDACTED]

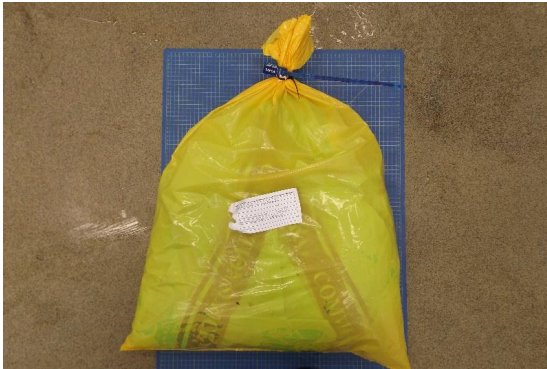


Fig. 1) Plastic bag upon arrival.



Fig. 2) Closer view of the RSPCA tag.



Fig. 3) Second RSPCA tag sealing the further internal plastic bag.



Fig. 4) Third opened yellow plastic bag with attached RSPCA tag.



Fig. 5) Panoramic view of the content of the second yellow plastic bag, as appeared at opening.



Fig. 6) Lateral view of the carcass.

Veterinary Laboratory Services
Case No.: 16L-4080
RSPCA Incident Number : [REDACTED]



Fig. 7) Lateral view of the carcass.



Fig. 8) Ventral view of the carcass.

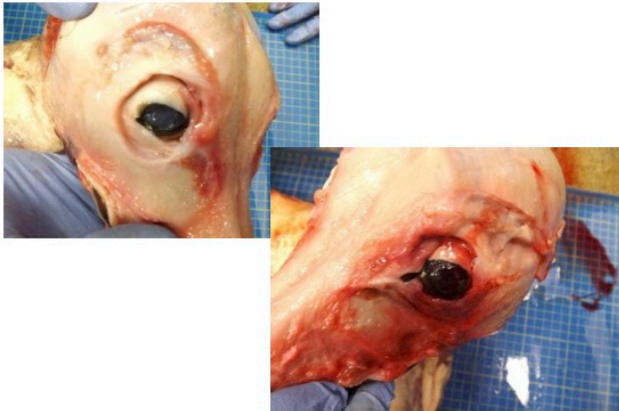


Fig. 9) Ocular regions after skinning. Moderate reddening of the left sclera.



Fig. 10) Subcutis of the right oral commissure.

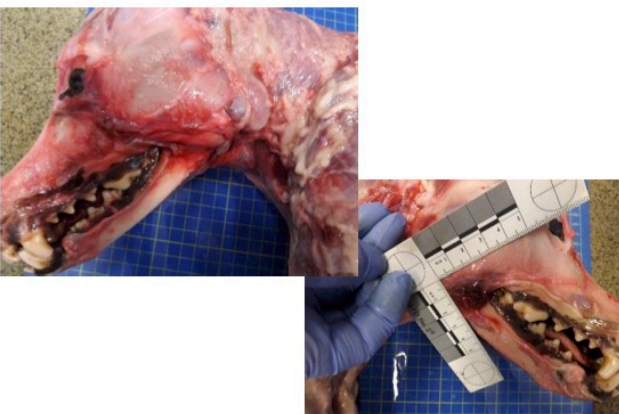


Fig. 11) Right and left sides of the skinned head.



Fig. 12) No microchip detected.

Veterinary Laboratory Services
Case No.: 16L-4080
RSPCA Incident Number : [REDACTED]



Fig. 13) 1.5 cm stabbed wound along the right lateral abdominal wall.

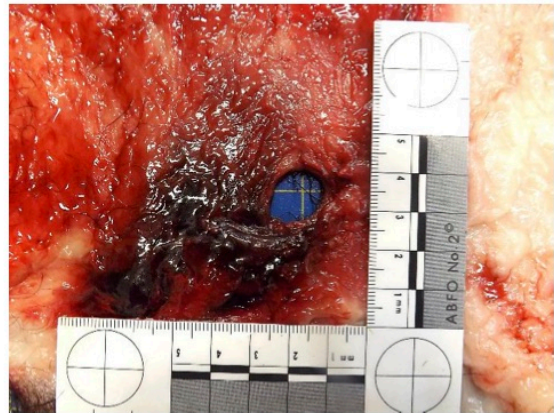


Fig. 14) Subcutaneous aspect of the abdominal stab wound.



Fig. 15) Stabbed abdominal wound after formalin fixation.

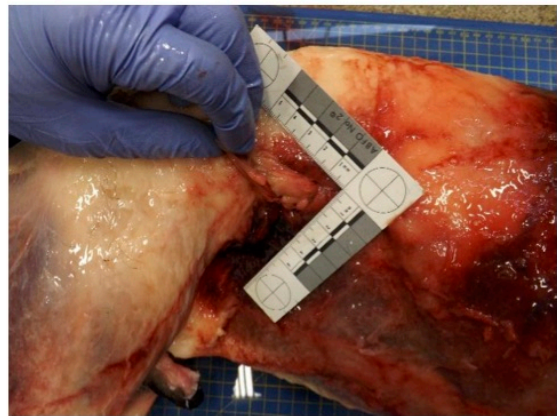


Fig. 16) Larger full-thickness penetrating hole through the abdominal wall (2 cm in length). A long cordon of omental fat is present and protruded outside.



Fig. 17) Thoracic stab wound.

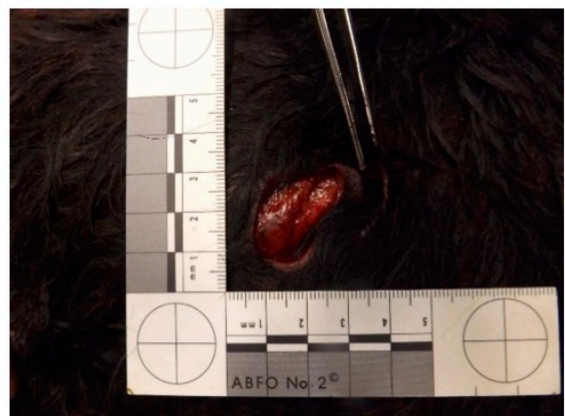


Fig. 18) Folded margin of the thoracic stabbed wound showing the sharp cut of the intercostal muscles almost completely hidden due to oblique blade orientation. **3**

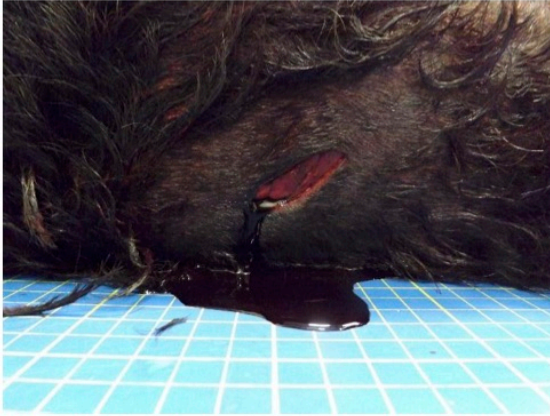


Fig. 19) Abundant amount of un-clotted blood oozing after rolling of the carcass.

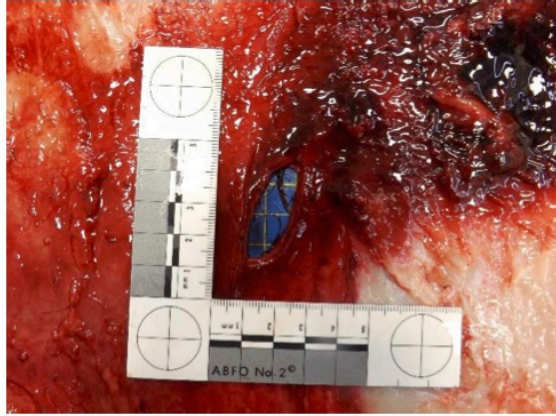


Fig. 20) Subcutaneous view of the thoracic stabbed wound.



Fig. 21) Formalin fixed thoracic stabbed wound.

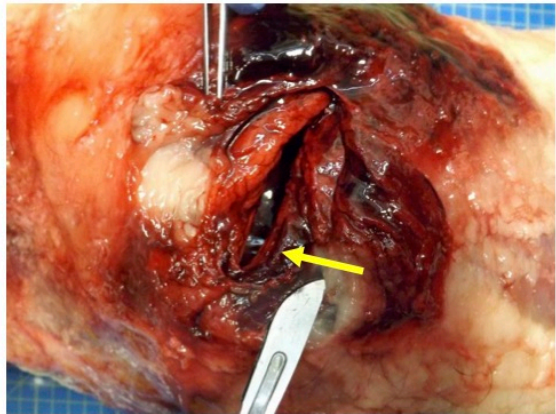


Fig. 22) Complete perforation of the thoracic wall. Note the sharp cut margins of the muscle (arrow).



Fig. 23) Right lateral aspect of the carcass, after complete skinning.

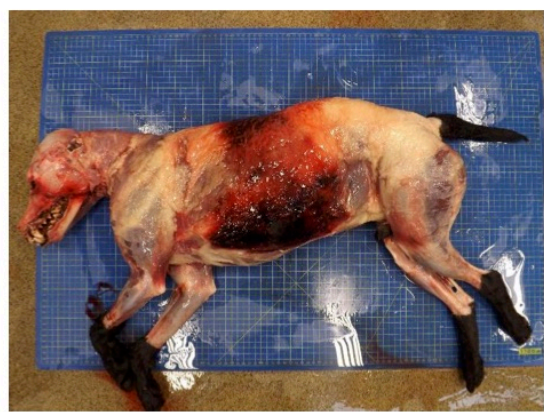


Fig. 24) Left lateral aspect of the carcass, after complete skinning.

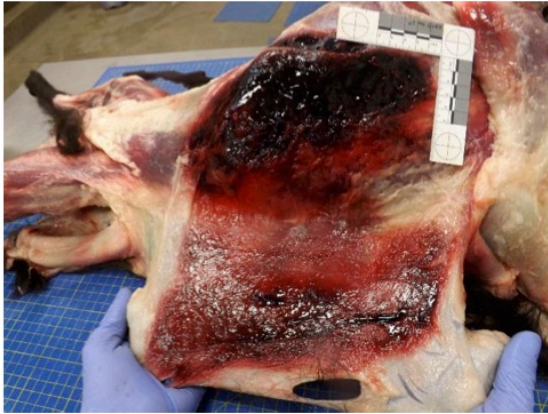


Fig. 25) Left subcutis, chest.

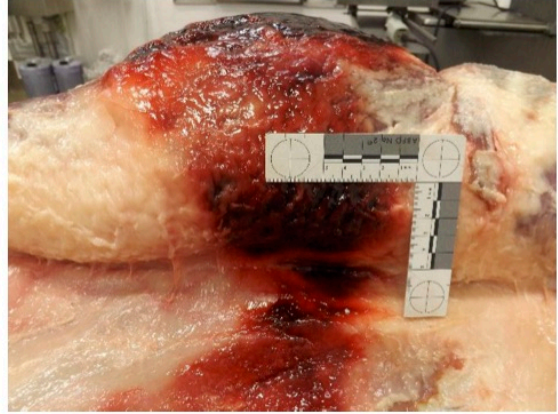


Fig. 26) Left latero-dorsal aspect of the thoracic subcutis, second large reddened area.

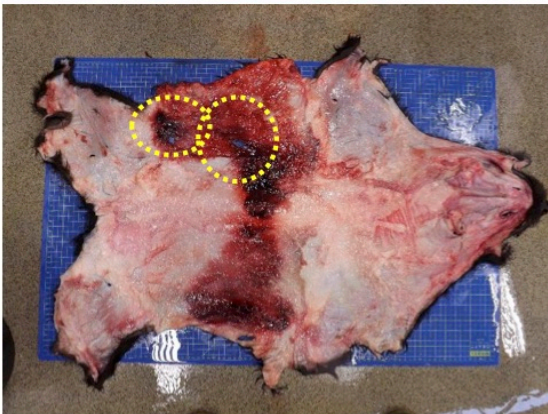


Fig. 27) Panoramic view of the subcutis. Dotted circles indicate two discrete stabbed wounds.

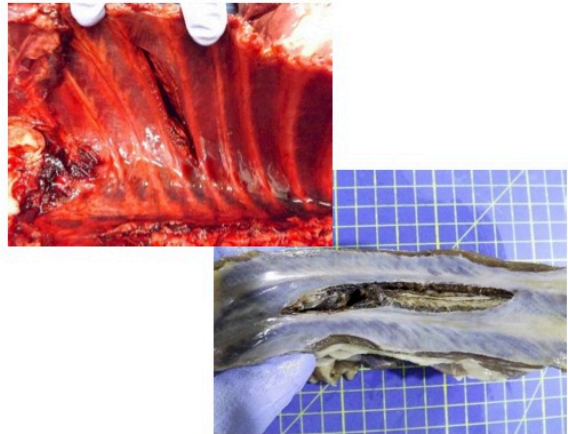


Fig. 28) Pleural aspect of the thoracic stabbed wound.



Fig. 29) Controlateral thoracic wall (left), pleural aspect.

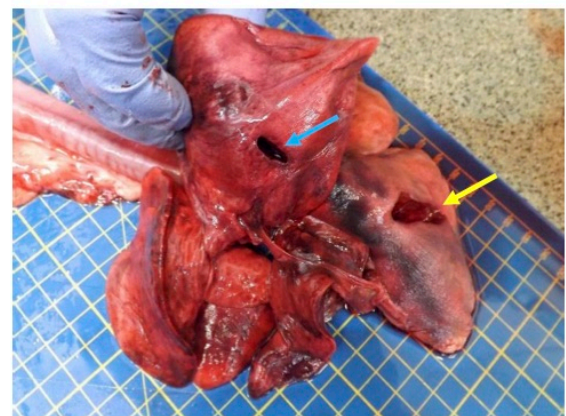


Fig. 30) Lung. Right caudal lobe (yellow arrow) and left caudal lobe perforations (blue arrow).

Veterinary Laboratory Services
Case No.: 16L-4080
RSPCA Incident Number : [REDACTED]

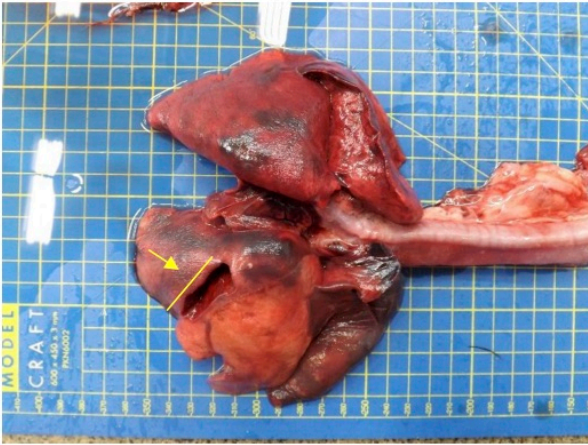


Fig. 31) Lungs.

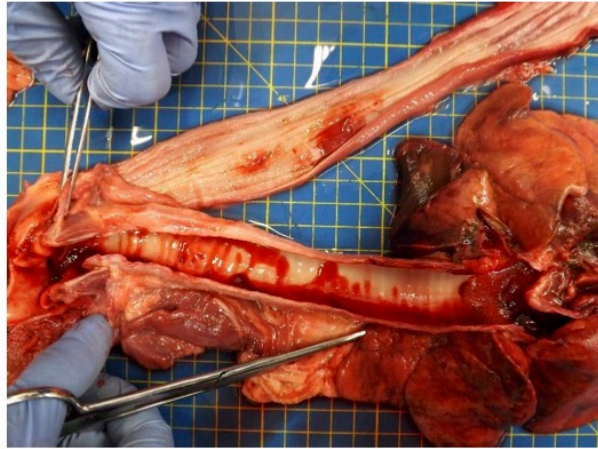


Fig. 32) Larynx and trachea, opened. Note the blood in the oesophagus.

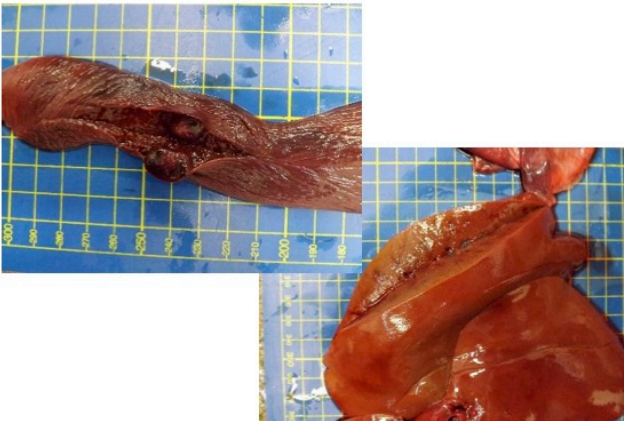


Fig. 33) Spleen and liver.

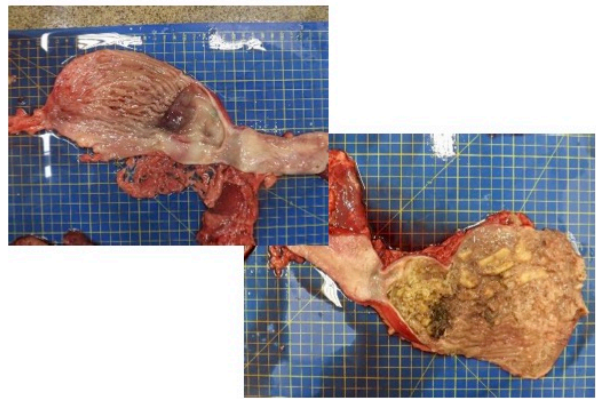


Fig. 34) Stomach, with and without content.

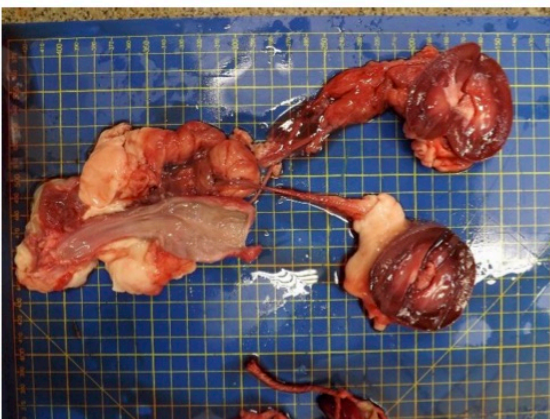


Fig. 35) Urogenital system.

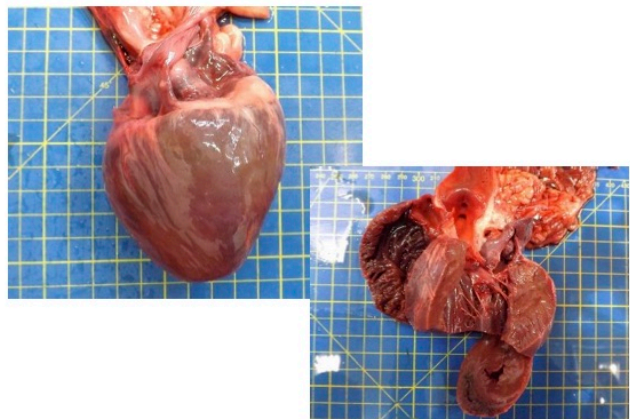


Fig. 36) Heart.

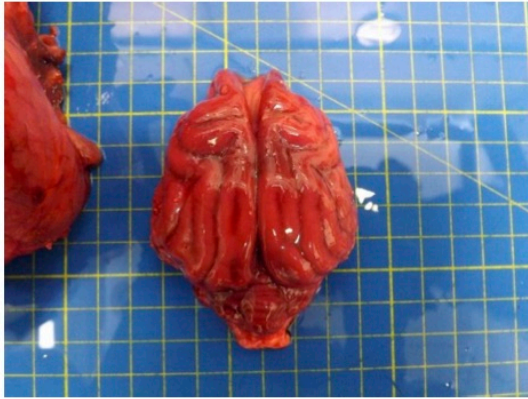


Fig. 37) Brain.

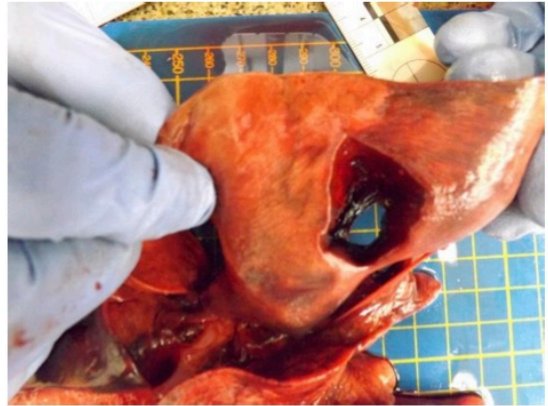


Fig. 38) Closer view of the large penetrating wound on the right caudal lobe of the lung.

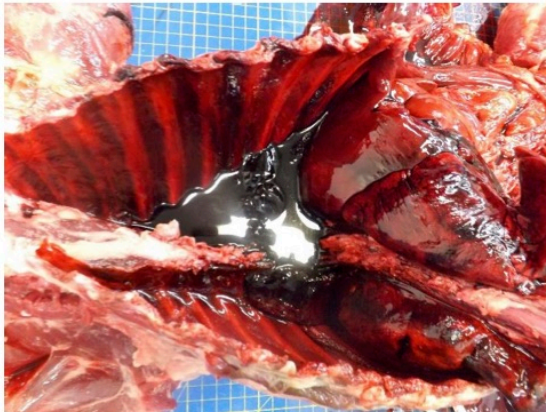


Fig. 39) Thoracic cavity.

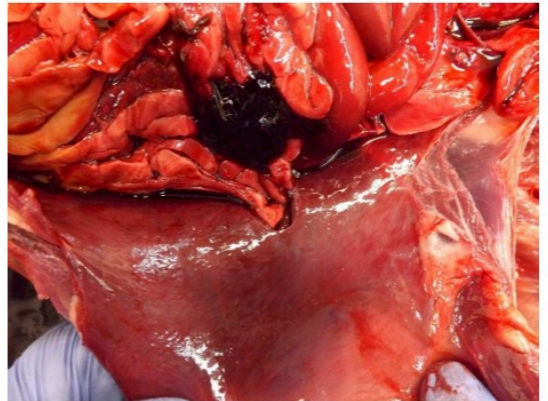


Fig. 40) Abdominal cavity.



Fig. 41) Intestine.

7.2 Scheda dati dell'anticorpo utilizzato nello studio:


abcam

Product datasheet

Anti-Corticotropin Releasing Factor antibody - C-terminal ab231443

[1 Image](#)

Overview

Product name	Anti-Corticotropin Releasing Factor antibody - C-terminal
Description	Rabbit polyclonal to Corticotropin Releasing Factor - C-terminal
Host species	Rabbit
Tested applications	Suitable for: IHC-P
Species reactivity	Reacts with: Human Predicted to work with: Mouse, Rat, Chicken, Dog, Pig, Frog 
Immunogen	Synthetic peptide corresponding to Human Corticotropin Releasing Factor (C terminal). Database link: P06850
Positive control	IHC-P: Human brain tissue.

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C long term. Avoid freeze / thaw cycle.
Storage buffer	pH: 7.60 Preservative: 0.099% Sodium azide Constituents: PBS, 1% BSA
Purity	Immunogen affinity purified
Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab231443** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

7.3 Protocollo della procedura di immunohistochimica utilizzata nello studio:

Codice a barre 55 : CRF 1:100 (15/10/2018)

Procedura: BMK ultraView DAB Par

Modulo BenchMark IHC/ISH

***** Selezionare EZ Prep *****

1 ***** Inizio tappe cronometrate *****

2 ***** Miscelatori disattivati *****

3 Riscaldare i vetrini a 75°C, e incubare per 4 minuti

4 Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)

5 Incubare per 4 minuti

6 Risciacquare il vetrino +

7 Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)

8 Incubare per 4 minuti

9 Risciacquare il vetrino +

10 Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)

11 Dispensare Coverslip

12 Riscaldare i vetrini a 76°C, e incubare per 4 minuti

13 Risciacquare il vetrino +

14 Aggiustare il volume di sparaffinatura

15 Dispensare Coverslip

16 Disattivare il riscaldamento dei vetrini

17 ***** Miscelatori attivati *****

18 [Breve - Cell Conditioning 8 minuti]

- 19 Risciacquare il vetrino +
- 20 Dispensare Cell Conditioner medio 1
- 21 Dispensare Coverslip per CC lungo
- 22 Riscaldare i vetrini a 95°C, e incubare per 8 minuti
- 23 [Ridotto - Cell Conditioning 30 minuti]
- 24 Dispensare Cell Conditioner medio 1
- 25 Dispensare Coverslip
- 26 Riscaldare i vetrini a 100°C, e incubare per 4 minuti
- 27 Dispensare Coverslip
- 28 Dispensare Cell Conditioner 1
- 29 Incubare per 4 minuti
- 30 Dispensare Coverslip
- 31 Dispensare EZ Prep e aggiustare il volume CC
- 32 Incubare per 4 minuti
- 33 Dispensare Coverslip
- 34 Dispensare Cell Conditioner medio 1
- 35 Incubare per 4 minuti
- 36 Dispensare Coverslip
- 37 Dispensare Cell Conditioner 1
- 38 Incubare per 4 minuti
- 39 Disattivare il riscaldamento dei vetrini
- 40 Incubare per 8 minuti
- 41 Risciacquare il vetrino +
- 42 Aggiustare il volume sul vetrino
- 43 Dispensare Coverslip

- 44 *****Selezionare Reaction Buffer *****
- 45 Riscaldare i vetrini a 37°C, e incubare per 2 minuti
- 46 Risciacquare il vetrino +
- 47 Aggiustare il volume sul vetrino
- 48 Dispensare una aliquota di UV INHIBITOR, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 49 Risciacquare il vetrino +
- 50 Aggiustare il volume sul vetrino
- 51 Dispensare Coverslip
- 52 ***** Applicare manualmente (Anticorpo primario) e incubare per [16 minuti]

- 53 Risciacquare il vetrino +
- 54 Dispensare 200 µl + VA di Buffer di Lavaggio
- 55 Dispensare una aliquota di UV HRP UNIV MULT, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
- 56 Risciacquare il vetrino +
- 57 Aggiustare il volume sul vetrino
- 58 Dispensare Coverslip
- 59 Risciacquare il vetrino +
- 60 Aggiustare il volume sul vetrino
- 61 Dispensare Coverslip
- 62 Risciacquare il vetrino +
- 63 Aggiustare il volume sul vetrino
- 64 Dispensare una aliquota di UV DAB e una aliquota di UV DAB H₂O₂, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti

- 65 Risciacquare il vetrino +
- 66 Aggiustare il volume sul vetrino
- 67 Dispensare una aliquota di UV COPPER, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 68 Risciacquare il vetrino +
- 69 Aggiustare il volume sul vetrino
- 70 Dispensare Coverslip
- 71 ***** Inizio tappe cronometrate *****
- 72 Risciacquare il vetrino +
- 73 Aggiustare il volume sul vetrino
- 74 Dispensare una aliquota di [HEMATOXYLIN] (Controcolorazione), aggiungere Coverslip e incubare per [8 minuti]
- 75 Risciacquare il vetrino +

Legenda: una goccia corrisponde ad una aliquota di reagente

8. BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, Subburaju, Young, Chen, (2008). The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Progress in Brain Research, 170*, 29–39.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00403-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00403-2)
- Anderson, Weed, Kochanek, Reich, Gillum, Maurer, Le, (2003). Instruction Manual: Lists for Tabulating Mortality Statistics. *Department of health and human services, centers for disease control and prevention*.
- Antuofermo, Cantile, Cantoni, Della Salda, Di Francesco, Fico, Gibelli, Grieco, Lanteri, Lepri, Magi, Mazzariol, Meomartino, Miletti, Militerno, Mutinelli, Paciello, Passantino, Pintus, Rodena, Rosato, Scaglione, Zoppi, (2018) .Linee guida nazionali per le autopsie a scopo forense in Medicina Veterinaria. *Ministero della Salute*.
- Astrup, Thomsen, (2007). The routine use of C-reactive protein in forensic investigations. *Forensic Science International, 172*, 49–55.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.10.021>
- Atzori, Cuevas-Olguin, Esquivel-Rendon, Garcia-Oscos, Salgado-Delgado, Saderi, Miranda-Morales, Trevvivo, Pineda, Salgado, (2016). Locus ceruleus norepinephrine release: A central regulator of CNS spatio-temporal activation? *Frontiers in Synaptic Neuroscience, 8*, 25.
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00025>
- Boenisch, Farmilo, Stead, Key, Welcher, Atwood, (2001). *Immunochemical staining methods (3rd ed., Ed. DAKO corporation, California)*.
- Bracha, (2004). Freeze, Flight, Fight, Fright, Faint: Adaptationist Perspectives on the Acute Stress Response Spectrum. *CNS Spectrums, 9*, 679–685.
<https://doi.org/10.1017/S1092852900001954>
- Codice Civile, Libro Terzo della Proprietà, sezione II dei beni mobili e immobili, art.812.
- Consiglio Nazionale FNOVI, 2019. Codice Deontologico.

- D'Arrigo, Provenzano, Torino, Zoccali, Tripepi. (2011). Master in Epidemiologia Clinica I Test Diagnostici E L' Analisi Della Curva Roc. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Società italiana di nefrologia*, 28, 642–647.
- Di Leva (2018). Brain anatomy from a clinical and neurosurgical perspective. A clinically oriented manual of neuroanatomy. *Medical University of Vienna, Mecquarie University*, 117p.
- De Lahunta, Glass (2009). Veterinary neuroanatomy and neurology (3rd ed., Ed. Elsevier Saunders, Missouri).
- Decreto legislativo 121, 7 luglio 2011. Attuazione della direttiva 2008/99/CE sulla tutela penale dell'ambiente, nonché della direttiva 2009/123/CE che modifica la direttiva 2005/35/CE relativa all'inquinamento provocato dalle navi e all'introduzione di sanzioni per violazioni. *Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana* 177, 1 agosto 2011.
- Hajian-Tilaki, (2013). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4, 627–635.
- Herman, Mcklveen, Ghosal, Kopp, Wulsin, Makinson, Scheimann, Myers, (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*. *Comprehensive Physiology*, 6, 603–621.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>.
- Jackson, (2014). Stress, Shock, and Adaptation in the Twentieth Century (Ed. David Cantor e Edmund Ramsden, Rochester NY).
- Legge 189, 20 luglio 2004. Disposizioni concernenti il divieto di maltrattamento degli animali, nonché di impiego degli stessi in combattimenti clandestini o competizioni non autorizzate. *Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana* 178, 31 luglio 2004.
- Legge 201, 4 novembre 2010. Ratifica ed esecuzione della Convenzione europea per la protezione degli animali da compagnia, fatta a Strasburgo il 13 novembre 1987, nonché norme di adeguamento dell'ordinamento interno. *Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana*, 283, 3 dicembre 2010.
- Legge 281, 14 agosto 1991. Legge quadro in materia di animali di affezione e di prevenzione del randagismo. *Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana* 203, 30 agosto 1991.

- Maeda, Ishikawa, Michiue, (2014). Forensic molecular pathology: Its impacts on routine work, education and training. *Legal Medicine*, 16, 61–69.
<http://doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.01.002>
- Makara, Mergl, Zelena, (2004). The role of vasopressin in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation during stress: An assessment of the evidence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018, 151–161.
<https://doi.org/10.1196/annals.1296.018>
- Mangina, Lugniera, Chaumonta, Offnerb, Gruckerb, (1983). Forensic significance of postmortem estimation of the blood cerebrospinal fluid barrier permeability. *Forensic Science International*, 22, 143–149.
[http://doi.org/10.1016/0379-0738\(83\)90007-5](http://doi.org/10.1016/0379-0738(83)90007-5)
- Michiue, Ishikawa, Kawamoto, Chen, Wang , Zhu, (2013). Postmortem serum levels of amylase and gamma glutamyl transferase (GGT) as markers of systemic tissue damage in forensic autopsy. *Legal Medicine*, 15, 79–84.
<https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.09.03>
- Moisan, Le Moal, (2012). Le stress dans tous ses états. *Medecine/Sciences*, 28, 612–617.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2012286014>
- Mosconi (1974). Codice penale. *Minerva Medica*, 65, 3255–3256.
- Munro (2008). Animal Abuse and Unlawful Killing, Forensic veterinary pathology (Ed. Saunders Elsevier, UK) .
- Muzi, Bologna, Romani, (1999). Tecniche di immunoistochimica. *Caleidoscopio*, 128.
- Palazzi, (2011). The beagle brain stereotaxic atlas (Ed. Springer, UK).
- Passantino, Fenga, Morciano, Morelli, Russo, Di Pietro, M. Passantino, (2006). Euthanasia of companion animals: a legal and ethical analysis. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 42, 491-495.

- Piette, Pieters, De Letter, (2011). Evaluation of the agonal stress: Can immunohistochemical detection of ubiquitin in the locus coeruleus be useful? *International Journal of Legal Medicine*, 125, 333–340.
<https://doi.org/10.1007/s00414-010-0434-8>
- Preece, (2003). Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Molecular Brain Research*, 118.
[http://doi.org/10.2016/S0169-328X\(03\)00337-1](http://doi.org/10.2016/S0169-328X(03)00337-1)
- Qin, Li, Tang, (2018). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Development, function, and human diseases. *Endocrinology*, 159, 3458–3472.
<https://doi.org/10.1210/en.2018-00453>
- Ramos-Vara, (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42, 405–426.
<https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Ramos-Vara, Miller, (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology*, 51, 42–87.
<https://doi.org/10.1177/0300985813505879>
- Reganne, Legako, Broadway, Carroll, Sanchez, Smith, Inek, (2019). Effects of pre-mortem stress on heat shock protein expression in the longissimus lumborum following harvest. *Animal Science*, 97, 107.
- Royal College of Veterinary Surgeon, (2015). RCVS Code of Professional Conduct for Veterinary Surgeons.
- Tsuda , Nakasono, (2006). Gene response of mouse skin to pressure injury in the neck region. *Legal Medicine*, 8.
<http://doi.org/10.1016/j.legalmed.2005.08.012>
- Smagin, Heinrichs, Dunn, (2001). The role of CRH in behavioral responses to stress. *Peptides*, 22, 713–724.
[https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00384-9](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00384-9)

Steckler, Holsboer, (1999). Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion.

Biological Psychiatry, 46, 1480–1508.

[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00170-5)

Stritt, Giraud, Lilaj, (2016). *Orbit Image Analysis Handbook* (Actelion).

Stritt, Stalder, Vezzali, (2019). Orbit Image Analysis: An open-source whole slide image analysis tool.

BioRxiv, 731000.

<https://doi.org/10.1101/731000>

The animal welfare act, 8 novembre 2006, *Parliament of the United Kingdom*.

Wang, Harris, (2015). *Glucocorticoid Signaling From Molecules to Mice to Man* (Ed. Springer, NY).

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8>

Wilke, Janßen, Fahrenhorst, Hecker, Manns, Brabant, Troger, Breitmeier, (2007). Postmortem determination of concentrations of stress hormones in various body fluids-is there a dependency between adrenaline/noradrenaline quotient, cause of death and agony time? *International Journal of Legal Medicine*, 121, 385–394.

<https://doi.org/10.1007/s00414-006-0132-8>

Zhu, Ishikawa, Michiue, Li, Zhao, Quan, Oritani, Bessho, Maeda, (2007). Postmortem serum catecholamine levels in relation to the cause of death. *Forensic Science International*, 173, 122–129.

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.02.013>

9. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Professor Randal Munro per aver gentilmente risposto alla mia e-mail ed avermi fatto conoscere Lorenzo Ressel, capo dipartimento di Patologia Veterinaria e Salute Pubblica dell'Istituto di Scienze Veterinarie dell'Università di Liverpool, il quale ha cortesemente messo a mia disposizione il materiale necessario alla ricerca.

Ringrazio il mio relatore, il Prof.re Massimo Castagnaro, per aver accolto con entusiasmo il mio progetto di tesi fornendomi il massimo supporto nella realizzazione dello stesso; i miei correlatori: il Dottor Emanuele Ricci il cui contributo, assieme a quello dell'Istituto di Scienze Veterinarie dell'Università di Liverpool, è stato fondamentale e la Dottoressa Ginevra Brocca che è stata molto paziente e presente nell'accompagnarmi durante tutto il percorso di stesura della tesi.

Meritata riconoscenza va inoltre alla mia famiglia che in questi anni mi ha supportata non solo economicamente ma anche psicologicamente, aiutandomi in maniera determinante nel raggiungimento di questo obiettivo. Ringrazio in particolare mia mamma, poiché oggi è un po' come se si laureasse anche lei dato il supporto emotivo incondizionato che mi ha sempre dato, e Giorgio, che in questi anni per me è stato come un padre, per le litigate e l'affetto che condividiamo.

Importante contributo mi è stato dato anche da chi, arrivato alla fine di questo mio lungo percorso, mi ha supportata in un periodo per me critico e difficile.

La mia gratitudine va infine rivolta anche a tutte quelle persone e a tutti gli animali che hanno contribuito e contribuiscono a mantenere vivi in me la passione e l'amore per la magnifica professione che è quella del Medico Veterinario.

