

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

ANALISI PROTEOMICA SULLE URINE DI GATTI AFFETTI DA AMILOIDOSI SISTEMICA

RELATORE

Prof. Eric Zini

Laureando

Monaco Amedeo

Matricola 1153717

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

INTRODUZIONE

ABSTRACT

CAPITOLO 1 – Cenni della malattia

- 1.1. Amiloide: patogenesi e classificazione
- 1.2. Amiloidosi nell'uomo patogenesi classificazione diagnosi
 - 1.2.1. Meccanismi di danno tissutale
 - 1.2.2. Segni e sintomi renali
 - 1.2.3. Diagnosi
- 1.3. Amiloidosi sistemica nei gatti
 - 1.3.1 Classificazione e patogenesi
 - 1.3.2 Trasmissione
 - 1.3.3 Diagnosi

CAPITOLO 2 – Materiali e metodi

- 2.1. Informazioni sui casi: criteri di inclusione dei gatti
- 2.2. Esame istopatologico
- 2.3. Esami di laboratorio standard: PU/CU, SDS page elettroforesi urinaria, SAA/CU
- 2.4. Analisi proteomica biomarker discovery

CAPITOLO 3 – Risultati

- 3.1. Segnalamento
- 3.2. Istopatologico
- 3.3. PU/CU, SDS page, SAA/CU, analisi proteomica
- 3.4. Proteomica

CAPITOLO 4 – Considerazioni conclusive

4.1 Analisi segnalamento

4.2 Analisi istologico

4.3 Analisi delle urine

4.4 Analisi proteomica

4.4.1 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoforma X1

4.4.2 Glutathione peroxidase 3

4.4.3 ApoA-IV

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

La finalità di questo studio è la ricerca di un biomarker nelle urine per quanto riguarda l'amiloidosi AA nei gatti.

Tale identificazione consentirà di separare, in maniera non invasiva, i gatti malati dai sani permettendo un approccio terapeutico verso l'amiloidosi con l'obiettivo di migliorare il benessere animale. Lo studio ha scelto le urine come substrato, oltre che per essere una procedura semplice e facilmente eseguibile, perché come riportato ampiamente in letteratura il rene risulta essere il principale organo in cui si depositano le fibre dell'amiloidosi.

Il seguente studio retrospettivo è stato eseguito tramite la raccolta di campioni istopatologici, che ci hanno permesso di differenziare i gatti malati dai sani, e di urine sulle quali sono stati eseguiti esami di laboratorio: peso specifico, PU/CU, SAA/CU. Particolare attenzione in questo studio è stata concessa all'analisi proteomica, che con un processo di biomarker discovery si porrà l'obiettivo di trovare proteine necessarie alla diagnosi della malattia.

ABSTRACT

The purpose of this study will be the search for a biomarker in the urine for AA amyloidosis in cats.

This identification will allow to separate, in a non-invasive way, the sick cats from the healthy ones, allowing a therapeutic approach towards amyloidosis with the aim of improving animal welfare. The study chose urine as a substrate, as well as to be a simple and easily performed procedure, because as widely reported in the literature, the kidney is the main organ in which amyloidosis fibers are deposited.

The following retrospective study was performed through the collection of histopathological samples, which allowed us to differentiate sick from healthy cats, and urine on which laboratory tests were performed: specific gravity, PU / CU, SAA / CU. Particular attention in this study was given to proteomic analysis, which with a biomarker discovery process will aim to find proteins necessary for the diagnosis of the disease.

CAPITOLO 1

Cenni della malattia

1.1 Amiloide: patogenesi e classificazione

Le amiloidosi sono un gruppo raro ed eterogeneo di disturbi caratterizzati dalla deposizione di proteine anormalmente ripiegate nei tessuti. Depositi di amiloide sono formati da proteine globulari solubili, che subiscono un ripiegamento errato e, successivamente, si aggregano in fibrille insolubili, portando a un progressivo danno d'organo.

L'amiloide è una sostanza proteica patologica depositata tra le cellule in vari tessuti e organi del corpo in un'ampia varietà di contesti clinici (Woldemeskel 2012). Sebbene nel deposito siano presenti altri componenti, la fibrilla proteica amiloide è il componente principale della sostanza amiloide (Figura 1.1). Il deposito differisce nella composizione proteica a seconda dei tipi di amiloidosi e delle diverse forme cliniche. Ciascuna entità clinica dell'amiloidosi può manifestarsi con una forma clinica distinta mediante una proteina fibrillare amiloide chimicamente specifica. Ciò indica che l'amiloide è una sostanza biochimicamente eterogenea, sebbene vi siano somiglianze nelle proprietà e nelle caratteristiche di colorazione. Le proteine aggregate possono essere alquanto amorfe a livello ultrastrutturale; tuttavia, nel caso dell'amiloidosi, le proteine aggregate e ripiegate in modo anomalo presentano una caratteristica struttura fibrillare altamente organizzata, anche se la loro sequenza amminoacidica è variabile (Zachary, 2017). Gli amiloidi hanno composizione chimica variabile in quanto il peptide amiloidogenico (costituente della parte più esterna, pari al 95%) deriva dalla deposizione di una proteina differente a seconda della patologia in atto. La deposizione può avvenire per due meccanismi: per una mutazione genetica della proteina o per l'azione di una proteasi che ne deforma la struttura. Internamente, l'amiloide è invece composta da un nucleo di componente AP (amyloid P component), glicoproteina globulare ed aggregati di condroitinsolfato ed eparansolfato (Attini e Rossi, 2020).

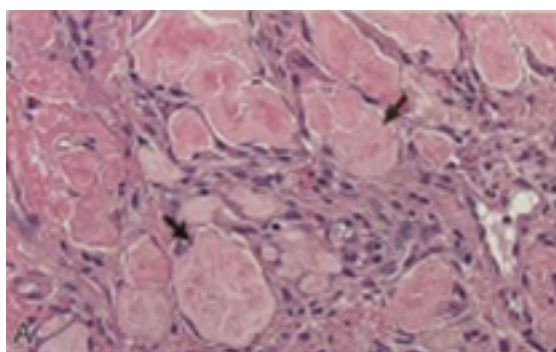


Figura 1.1: *L'amiloide appare sotto forma di depositi debolmente acidofili da omogenei a vagamente fibrillari nell'interstizio della mucosa nasale. Colorazione EE. Fonte: Dr. M.A. Miller, 2017.*

L'amiloidosi configura così come un gruppo di disturbi biochimicamente diversificati, aventi in comune uno stesso meccanismo patogenetico (ripiegamento anomalo di proteine) e lo stesso aspetto morfologico. Nell'amiloidosi, non solo viene in genere perduta la funzione biologica delle proteine ripiegate in modo scorretto, ma anche il tessuto in cui si deposita l'amiloide può risultare danneggiato (Zachary, 2017).

Il ripiegamento proteico è il processo fisico mediante il quale una catena proteica viene tradotta nella sua struttura tridimensionale nativa, tipicamente una conformazione "ripiegata" mediante la quale la proteina diventa biologicamente funzionale. Attraverso un processo rapido e riproducibile, un polipeptide si ripiega nella sua caratteristica struttura tridimensionale da una bobina casuale (Alberts et al., 2022) (Figura 1.2).

Ogni proteina esiste prima come un polipeptide spiegato o una bobina casuale dopo essere stata traslata da una sequenza di mRNA a una catena lineare di amminoacidi. In questa fase il polipeptide manca di qualsiasi struttura tridimensionale stabile (di lunga durata). Mentre la catena polipeptidica viene sintetizzata da un ribosoma, la catena lineare inizia a piegarsi nella sua struttura tridimensionale.

Il ripiegamento di molte proteine inizia anche durante la traslazione della catena polipeptidica. Gli amminoacidi interagiscono tra loro per produrre una struttura tridimensionale ben definita, la proteina ripiegata, nota come stato nativo. La struttura tridimensionale risultante è determinata dalla sequenza di amminoacidi o dalla struttura primaria (Anfinsen, 1972).

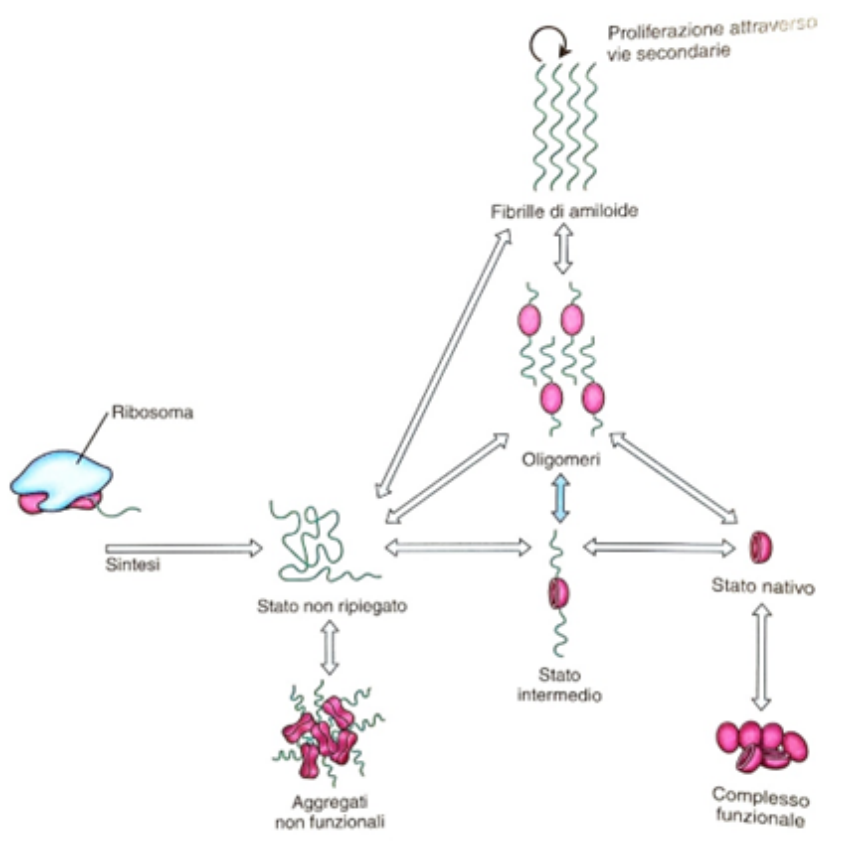


Figura 1.2: Meccanismi del ripiegamento delle proteine e della risposta alle proteine non ripiegate. Fonte: Zachary, 2017

La dinamica delle proteine è importante: la corretta struttura tridimensionale è essenziale per funzionare (Berg et al., 2002). Tuttavia, alcune parti delle proteine funzionali possono rimanere dispiegate; nello specifico, una proteina è considerata ripiegata in modo errato se non riesce a raggiungere il suo stato nativo normale. Ciò può essere dovuto a mutazioni nella sequenza amminoacidica o all'interruzione del normale processo di piegatura da parte di fattori esterni. (Chaudhuri 2006). Il mancato ripiegamento nella struttura nativa può produrre sia, come accade generalmente, proteine inattive sia proteine mal ripiegate che assumono una funzionalità modificata o tossica. Si ritiene che diverse malattie neurodegenerative e di altro tipo derivino proprio dall'accumulo di fibrille amiloidi formate da proteine mal ripiegate, le cui varietà infettive sono note come prioni (Selkoe, 2003). Il ripiegamento errato delle proteine può innescare l'ulteriore ripiegamento errato e l'accumulo di altre proteine in aggregati o oligomeri. L'aumento dei livelli di proteine aggregate nella cellula porta alla formazione di strutture simili all'amiloide che possono causare disturbi degenerativi e morte cellulare (Chaudhuri e Paul, 2006).

La proteina mal ripiegata contiene tipicamente fogli β che sono organizzati in una disposizione sopramolecolare nota come struttura a β incrociata. Questi assemblaggi ricchi di fogli β sono molto stabili, molto insolubili e generalmente resistenti alla proteolisi. Gli amiloidi sono strutture fibrillari che contengono legami idrogeno intermolecolari altamente insolubili e costituiti da aggregati proteici convertiti (Chaudhuri e Paul, 2006). La stabilità strutturale di questi complessi fibrillari è causata da ampie interazioni tra i monomeri proteici, formati da legami idrogeno della spina dorsale tra i loro filamenti β (Soto et al., 2006).

Data l'insolubilità dei legami idrogeno, la via del proteasoma potrebbe non essere sufficiente per degradare le proteine mal ripiegate prima dell'aggregazione.

Infatti la mancata eliminazione delle proteine, attraverso i proteasomi (proteosomi), complessi di proteasi ATP-dipendenti che degradano all'interno della cellula le proteine aberranti tramite reazioni di proteolisi, genera l'accumulo di fibrille amiloidi. Tali strutture β sono la causa di patologie che prendono il nome di amiloidosi (Alberts et al., 2022).

Le proteine mal ripiegate possono quindi interagire tra loro e formare aggregati strutturati e ottenere tossicità attraverso interazioni intermolecolari (Chaudhuri e Paul, 2006).

Tale struttura conferisce inoltre qualità ottiche e tintoriali permettendo, attraverso la colorazione Rosso Congo, l'assunzione di una tonalità rosso-arancio (congofilia) (Figura 1.3).

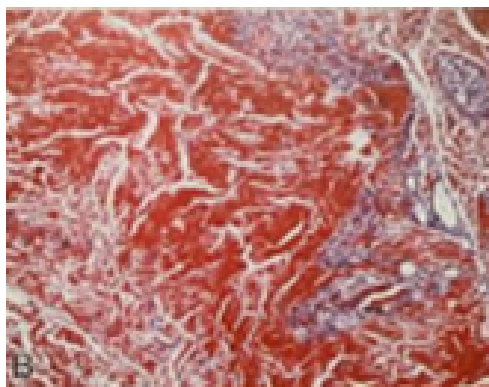


Figura 1.3: Le sostanze congofile, come l'amiloidi, si colorano in rosso-arancio con la colorazione rosso Congo. Fonte: Dr. M.A. Miller, 2017.

È importante notare come la periodicità molecolare caratterizzante l'amiloide ne determini l'anisotropia. Le sostanze anisotrope sono birifrangenti, ovvero possono riflettere la luce polarizzata in due raggi che vibrano in onde perpendicolari. Pertanto, quando le sezioni istologiche vengono osservate attraverso il microscopio a luce polarizzata (ottenibile inserendo un filtro polarizzatore tra la sorgente luminosa e la sezione istologica), i depositi di amiloide o altre sostanze anisotrope (per esempio i cristalli e il collagene) possono ruotare il piano della luce in modo da farla passare attraverso l'analizzatore (un secondo filtro polarizzatore posizionato tra la sezione istologica e gli oculari), mentre ciò accade solo per una quantità trascurabile di luce nel caso di sostanze isotrope.

L'amiloide, inoltre, possiede una caratteristica birifrangenza verde mela alla luce polarizzata, specialmente dopo colorazione con rosso Congo (Zachary, 2017) (Figura 1.4). Inoltre, la particolare disposizione delle proteine garantisce l'insolubilità e la resistenza alla proteolisi in vivo (Attini e Rossi, 2020)

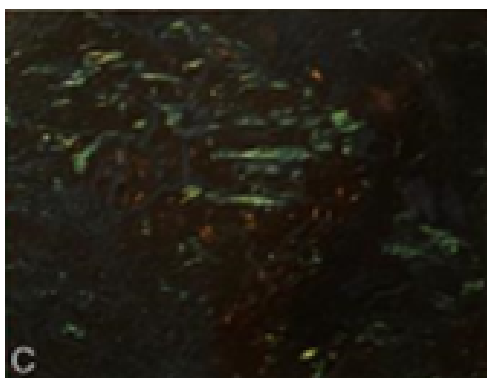


Figura 1.4: Osservata a luce polarizzata, l'amiloide è birifrangente e di colore "verde mela".
Colorazione con rosso Congo, stesso campo e stesso ingrandimento di B. Fonte: Dr. M.A. Miller, 2017.

Con il termine amiloidosi ci riferiamo a un gruppo eterogeneo di malattie causate dalla deposizione extracellulare, in vari tessuti del corpo, di proteine fibrillari insolubili di circa 10 nm con una conformazione appunto a foglio β -piegheggiato (Jansen et al., 1985).

Secondo il sottocomitato per la nomenclatura dell'OMS-IUIS, l'amiloide e l'amiloidosi sono classificate in base alla proteina della fibrilla amiloide, seguita da una designazione

del precursore della proteina della fibrilla. La lettera maiuscola A per amiloide è seguita dalla designazione della proteina in forma abbreviata. Ad esempio, l'amiloide AL si riferisce all'amiloide derivata dalla catena leggera delle immunoglobuline e può essere osservata nell'amiloidosi inclusa l'amiloidosi idiopatica (primaria) associata a mieloma o macroglobulinemia (Segev G. et al.). L'origine della fibrilla nell'amiloidosi AL è una catena leggera di immunoglobuline o un frammento di catena pesante di immunoglobuline (Gertz, 2003). Alla proteina della fibrilla amiloide nella catena pesante delle immunoglobuline è stata assegnata la designazione AH (Who-iuis, 1993).

La classificazione delle forme di amiloidosi può essere condotta sia in base alle proteine responsabili della malattia, sia in base alla localizzazione della malattia stessa. Per quanto concerne la prima classificazione, il deposito di amiloide può essere quindi classificato in base a varie proteine precursori, identificate in diversi tipi e forme di amiloidosi. Ad esempio, i precursori proteici A β e β (β PP) sono rispettivamente identificati come la proteina della fibrilla amiloide e il suo precursore nella malattia di Alzheimer. Il polipeptide amiloide insulare è un precursore della proteina amiloide AIAPP depositata nell'amiloidosi pancreatica. Portando ad esempio la medicina umana, la forma di amiloidosi familiare nell'uomo potrebbe essere dovuta a mutazioni nel fibrinogeno, nel lisozima, nell'apolipoproteina AI e nella transtiretina (con ATTR come proteina amiloide). È stato riportato che l'amiloidosi sistemica ereditaria umana con coinvolgimento renale, clinicamente indistinguibile dal deposito di amiloide AL, presenta deposizione di apolipoproteina AI (apoAI) o AII, lisozima o fibrinogeno. La deposizione di transtiretina nativa è anche associata ad amiloidosi sistemica senile nei pazienti anziani. (Gertz, 2003) (Who-iuis, 1993). Attualmente, nell'uomo e negli animali sono stati identificati rispettivamente 36 e 10 tipi di proteine precursori dell'amiloide (Benson et al., 2018).

Per quanto concerne la localizzazione si tratta di una classificazione di tipo clinico che distingue due forme: localizzata e sistemica. La forma localizzata colpisce un solo organo ed è piuttosto rara negli animali domestici. Ne sono un esempio l'amiloidosi delle isole pancreatiche del gatto (le cellule β del pancreas che producono in quantità eccessiva amilina che si deposita tra di esse danneggiandole fino a causare un diabete

principalmente di tipo II) e il plasmocitoma extra midollare cutaneo o gastroenterico (i quali producono sostanza amiloide associata alle globuline).

La forma sistemica è invece la più frequente e coinvolge più organi; comprende la forma reattiva, la forma di carattere ereditario-familiare e quella associata a discrasia delle immunoglobuline. Nel cane e nel gatto la deposizione di sostanza amiloide avviene principalmente nel rene e nel fegato, ma possono anche essere coinvolti altri tessuti (cuore, milza, surreni, linfonodi, pancreas e tratto gastroenterico, sistema nervoso, vasi sanguigni). La deposizione può essere talmente grave da determinare la rottura dell'organo coinvolto (Attini e Rossi, 2020).

La nostra conoscenza dell'amiloidosi spontanea negli animali è limitata rispetto a quella che si sa della malattia negli esseri umani. La maggior parte degli studi nei mammiferi sono stati condotti su animali domestici e da laboratorio. Recensione di letteratura, tuttavia, mostra che si verificano anche amiloidosi spontanee anche in altre specie (Jakob, 1971). In particolare, negli animali da compagnia, la deposizione di amiloide AA si verifica in forma familiare in razze specifiche, inclusi gatti abissini e siamesi e cani Shar-Pei (Woldemeskel) (Paltrinieri S et al.). Poiché non esiste una classificazione universalmente accettata, è difficile riassumere i vari modelli di amiloidosi nei mammiferi. Ci sono, tuttavia, due metodi pratici di classificazione: un raggruppamento condotto secondo i modelli di distribuzione anatomica dei depositi amiloidi oppure una classificazione basata sui possibili fattori eziologici o malattie associate (Jakob, 1971). La revisione di letteratura su quest'ultima classificazione evidenzia, ad esempio, che nei gatti si possono distinguere una forma di amiloidosi associata a ipervitaminosi cronica A (Clark, 1968) (Clark, 1969) da una associata a gastroenterite cronica (Hjarre, 1933) (Mathis, 1887).

Nelle amiloidosi umane, le proteine dell'amiloide (SAPs), come la componente P dell'amiloide sierica (SAP) e l'apolipoproteina E (ApoE), si depositano nei tessuti insieme alle fibrille amiloidi e sono implicate nello sviluppo dell'amiloidosi. Pochi rapporti descrivono gli SAP negli animali. Uno studio ha esaminato l'amiloidosi felina ed eseguito analisi immunoistochimiche e proteomiche di SAP, ApoE, apolipoproteina A-I (ApoAI) e apolipoproteina A-IV (ApoAIV). La ricerca ha rilevato l'ApoE in tutti i tipi di amiloide, suggerendo il coinvolgimento dell'ApoE nello sviluppo dell'amiloidosi felina. Gli SAP

nell'amiloidosi felina sono significativamente diversi da quelli nell'uomo, suggerendo che il coinvolgimento degli SAP nella condizione patologica differisce tra le specie animali (Miyazaki et al., 2020).

La forma più comunemente segnalata negli animali è l'amiloidosi AA. Essa è derivata dalla deposizione della proteina amiloide-A sierica (SAA), un'apolipoproteina prodotta nel fegato su stimolazione da parte di citochine pro-infiammatorie durante disturbi infiammatori o neoplastici. Questa forma di amiloidosi AA viene definita reattiva. (Ménsua C et al.) (Zhang B et al.)

L'esatta patogenesi dell'amiloidosi AA non è stata completamente chiarita. Tuttavia, sono state proposte diverse ipotesi, come l'aumento delle concentrazioni circolanti di SAA insieme a difetti nelle proprietà degradanti dei monociti o anomalie strutturali genetiche delle proteine (Woldemeskel M.). Altri fattori, come fattori di potenziamento dell'amiloide e glicosaminoglicani, possono eventualmente prendere parte all'amiloidogenesi accelerando la deposizione di amiloide-fibrilla (Gruys et al.).

È stato dimostrato che la trasmissibilità dell'amiloidosi AA in alcune specie animali avviene attraverso un meccanismo di seeding-nucleation-dipendente simile a un prione (Murakami T et al.). Inoltre, lo sviluppo dell'amiloidosi AA nei topi sembra essere accelerato dalla somministrazione orale di fibrille amiloidi estratte da esseri umani e bovini affetti, portando all'ipotesi di trasmissibilità interspecie (Cui D, Kawano H, Takahashi M, et al.). La presenza di amiloidi AA nelle feci dei ghepardi ha indicato una potenziale via di trasmissione oro-fecale in questa specie (Zhang B, Une Y, Fu X, et al.).

Negli animali i segni clinici dipendono dalla localizzazione e dalla quantità dei depositi e riflettono l'entità del danno d'organo. Nell'amiloidosi felina AA, la deposizione di amiloide AA è stata osservata principalmente nel fegato e nei glomeruli renali, portando rispettivamente a rottura del fegato e insufficienza renale (Beatty et al., 2002). La malattia renale cronica è comune nei gatti abissini affetti e nei cani Shar-Pei, mentre la disfunzione epatica è stata segnalata nei gatti siamesi con depositi di fegato. Diversi studi hanno descritto l'amiloidosi AA nei gatti siamesi e abissini, mentre è stata segnalata raramente nei gatti domestici a pelo corto (Mawby DI et al.) (Blunden AS et al.). L'amiloidosi è stata segnalata in un terzo dei gatti naturalmente infettati dal virus

dell'immunodeficienza felina (FIV), ma non in quelli infettati sperimentalmente (Asproni P et al.).

Nei gatti sono stati riportati vari tipi di amiloidosi: l'amiloidosi dell'amiloide A (AA), l'amiloidosi delle isole (il cui precursore è il polipeptide amiloide insulare (IAPP)) e tumori odontogeni produttori di amiloide (APOT) (Delaney et al., 2013) (Hirayama et al., 2017) (Benson et al., 2018). L'amiloidosi delle isole è stata frequentemente osservata nei gatti anziani con diabete mellito (Westermarck et al., 2011) (Samah et al., 2019). Nei gatti l'amiloidosi sistemica è nota come amiloidosi AA, mentre casi di amiloidosi delle catene leggere sistemiche (AL) e l'amiloidosi da transtiretina (ATTR) non sono stati riportati in questa specie.

1.2 Amiloidosi nell'uomo patogenesi classificazione diagnosi

1.2.1 Meccanismi di danno tissutale

Sebbene i meccanismi del danno tissutale nell'amiloide non siano stati completamente chiariti, è stato dimostrato che la presenza di grandi quantità di amiloide nell'interstizio interrompe l'architettura dei tessuti e interferisce con la funzione fisiologica degli organi colpiti. (Pepys, M. B. et. Al.)

Studi in vitro hanno inoltre dimostrato che la formazione di fibrille amiloidi spesso procede attraverso un processo di crescita nucleata che ricorda la cristallizzazione. Partendo da una soluzione di proteine monomeriche si ha una fase iniziale di latenza, ma una volta generato un nucleo critico inizia la formazione di fibrille che procede con cinetiche molto veloci; un'ulteriore proteina precursore amiloidogenica nella sua conformazione incline all'aggregazione, presumibilmente parzialmente dispiegata, viene rapidamente incorporata nelle fibrille in crescita. (Chiti et. All)

Tali dinamiche presentano implicazioni cliniche; la clearance naturale dell'amiloide non riesce a sostenere la continua formazione delle fibrille.

Nonostante l'eventuale terapia tracce di amiloide possono permanere nei tessuti, conseguentemente esse, verranno utilizzate come nucleo di partenza e innescheranno un rapido riaccumulo dei depositi di amiloide. (Hawkins et. All)

La rilevanza clinica di questi risultati in vitro è evidenziata nei casi di amiloidosi AA in cui la funzione renale diminuisce rapidamente in associazione con un breve scoppio infiammatorio caratterizzato da livelli elevati di SAA, nonostante un precedente graduale miglioramento della proteinuria risultante dal controllo prolungato della produzione di SAA. (Gilmore et al).

Come già affermato, tale malattia può presentare un naturale tropismo d'organo, sebbene la deposizione di amiloide possa verificarsi in quasi tutti gli organi.

Il rene risulta sicuramente tra i più colpiti, ed è stato dimostrato che la sua funzione fisiologica viene interrotta a causa della deposizione di matrice che inficia l'architettura dell'organo. (Pepys, et. All)

1.2.2 Segni e sintomi renali

I sintomi clinici associati all'amiloidosi AL sono vaghi e non specifici. Includono affaticamento, edema periferico, perdita di peso, dispnea da sforzo e ipotensione ortostatica. (Di Girolamo M. et. al.) Nei soggetti con amiloidosi ATTR, la presentazione comprende palpitazioni (fibrillazione atriale), dispnea da sforzo e edema. Questi sintomi sono vaghi (sensibili ma non specifici) e ci sono molti disturbi in grado di produrre sintomi simili che sono molto più comuni dell'amiloidosi sistemica. In un'indagine su 459 pazienti con amiloidosi, solo il 26% ha riferito di aver ricevuto la diagnosi di amiloidosi entro 1 anno dall'insorgenza dei sintomi e il 49% ha riferito di aver consultato 4 o più medici prima di stabilire una diagnosi. (Lousada I. et. al.)

1.2.3 Diagnosi

In questo paragrafo andremo ad analizzare l'iter diagnostico in medicina umana.

La diagnosi di amiloidosi si basa su un forte sospetto clinico. Tuttavia, i sintomi della malattia tendono a manifestarsi in fase molto avanzata e per di più con sintomi molto variabili e spesso aspecifici.

Infatti, nel momento in cui viene fatta diagnosi di amiloidosi, spesso si è verificata una disfunzione d'organo avanzata e irreversibile; quindi, risulta estremamente necessario

monitorare una serie di sintomi associati a tale malattia per poter eseguire una diagnosi quanto più precoce.

Qualsiasi paziente con sospetta amiloidosi dovrebbe sottoporsi a una biopsia per cercare la presenza di depositi di amiloide e un risultato positivo dovrebbe richiedere una serie di indagini per identificare la proteina fibrillare amiloide e il coinvolgimento e la disfunzione degli organi associati.

(Gillmore JD, Hawkins PN. Pathophysiology and treatment of systemic amyloidosis. *Nat Rev Nephrol.* 2013 Oct.pdf).

Dovrebbero richiamare ancora di più l'attenzione, specifiche combinazioni di sintomi, come sindrome nefrosica e insufficienza cardiaca; neuropatia periferica e autonoma; insufficienza cardiaca a pareti spesse con elettrocardiogramma normale o a bassa tensione; sindrome del tunnel carpale ricorrente; una combinazione di sindrome del tunnel carpale e insufficienza cardiaca negli anziani; e la storia familiare appropriata.

(Ashutosh D Wechalekar, Julian D Gillmore, Philip N Hawkins, Systemic amyloidosis,) Pertanto, risulta necessario data la patogenesi della malattia, un approccio graduale alla diagnosi e alla stadiazione dell'amiloidosi; tramite la conferma della deposizione di amiloide, l'identificazione del tipo di fibrilla, la valutazione del disturbo amiloidogenico sottostante e la valutazione dell'estensione e della gravità del coinvolgimento dell'organo amiloidico.

Una volta che i sintomi ci portano a sospettare l'amiloidosi, sarà fondamentale seguire l'algoritmo diagnostico; come mostrato in Fig. 1.5.

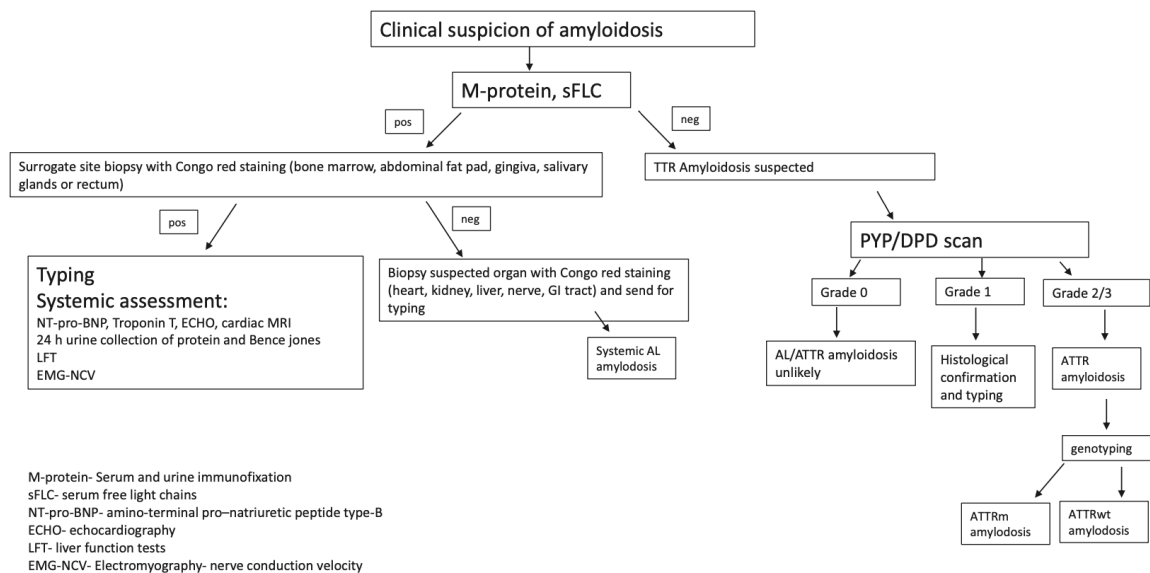


Fig. 1. The diagnostic algorithm for AL and ATTR amyloidosis.

Figura 1.5. The diagnostic algorithm for AL and ATTR amyloidosis (iuliana vaxman et al.)

Quindi gli esami di laboratorio, ad opera degli ematologi, svolgono il primo passo necessario per un corretto iter diagnostico.

Essi sono seguiti, per quanto concerne AL, dalla presenza di una sindrome sistemica (es. coinvolgimento renale, epatico, cardiaco, del tratto gastrointestinale o dei nervi periferici), una documentazione istologica dell'amiloide mediante colorazione rosso Congo, evidenza di un disturbo monoclonale delle plasmacellule (in siero, urina o in una biopsia del midollo osseo) e la tipizzazione proteica che supporta la diagnosi (Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al.)

Tuttavia, i pazienti che presentano AL localizzata in situ come: orbita, colon, tratto urinario (Kyle RA et al.) e vie aeree (Dominguez S et al.); risulteranno negativi ai test per le immunoglobuline monoclonali in siero e urina.

Questi risultati ci consentiranno di differenziarla dall'amiloidosi sistemica e di adeguare la terapia. (Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, Fermand JP, Hazenberg BP, Hawkins PN, et al.)

Questa entità non dovrebbe essere trattata allo stesso modo e quindi è importante differenziarla dall'amiloidosi sistemica. (Gertz MA, et al.)

Il decorso clinico è generalmente benigno e la prognosi a lungo termine dell'amiloidosi localizzata trattata con radiazioni (Cooper CT) o la chirurgia è buona. (al-Ratrout JT et al.)

Per evidenziare i depositi di fibra amiloide sarà necessario eseguire una biopsia tissutale. Dimostrandone la presenza attraverso campioni di tessuto prelevati dal sito surrogato (midollo osseo, cuscinetto adiposo addominale, gengiva, ghiandole salivari o retto) o da un organo sospetto (cuore, rene, fegato, nervo, tratto gastrointestinale). Un campione di tessuto può essere sottoposto a biopsia o ottenuto direttamente dall'organo interno interessato, ma il sito di prima linea della biopsia è il grasso addominale sottocutaneo, noto come "biopsia del cuscinetto adiposo", per la sua facilità di acquisizione. (Merlini G. et al.) Una biopsia del grasso addominale non è completamente sensibile e può risultare in falsi negativi, il che significa che un risultato negativo non esclude la diagnosi di amiloidosi. (Wechalekar AD et al.)

Il tipo della proteina amiloide può essere determinato in vari modi: il rilevamento di proteine anomale nel sangue (sull'elettroforesi delle proteine o sulla determinazione delle catene leggere); legame di particolari anticorpi all'amiloide presente nel tessuto (immunoistochimica); o estrazione della proteina e identificazione dei suoi singoli aminoacidi. (Dember LM et al.) L'immunoistochimica può identificare l'amiloidosi AA nella maggior parte dei casi, ma può non rilevare molti casi di amiloidosi AL. (Ebert EC et al.) La microdissezione laser con spettrometria di massa è il metodo più affidabile per identificare le diverse forme di amiloidosi.

L'AL era precedentemente considerata la forma più comune di amiloidosi e una diagnosi spesso inizia con la ricerca di discrasia plasmacellulare, cellule B della memoria che producono immunoglobuline aberranti o porzioni di immunoglobuline. L'elettroforesi di immunofissazione dell'urina o del siero è positiva nel 90% delle persone con amiloidosi AL. (Falk RH. Et al.) L'elettroforesi di immunofissazione è più sensibile dell'elettroforesi normale, ma potrebbe non essere disponibile in tutti i centri. In alternativa, la colorazione immunoistochimica di una biopsia del midollo osseo alla ricerca di plasmacellule dominanti può essere ricercata in persone con un alto sospetto clinico di amiloidosi AL ma elettroforesi negativa. [Falk RH et al.]

1.3 Amiloidosi sistemica nei gatti

1.3.1 Classificazione e patogenesi

L'amiloidosi AA (amiloidosi infiammatoria/reattiva/secondaria da infiammazione cronica) è la forma più comune di amiloidosi negli animali domestici. L'esatta patogenesi non è ancora stata chiarita, sono state formulate varie ipotesi; tra queste si è notata l'associazione con malattie infiammatorie croniche o neoplastiche (discrasia non immunocitaria), oppure con forme idiopatiche, dove non si riscontra alcuna malattia sottostante. In questa forma di amiloidosi, l'amiloide A depositata è derivata dal reagente di fase acuta, l'amiloide-A sierica (SAA), che è un'apolipoproteina delle lipoproteine ad alta densità (HDL), classi 2 e 3. Si forma principalmente nel fegato per stimolazione da parte di citochine pro-infiammatorie e svolge normalmente un ruolo nel trasporto del colesterolo e come chemiotattico nei processi infiammatori. Quando la concentrazione di questa molecola aumenta, tipicamente a causa di un'infiammazione cronica, alcune isoforme di SAA vengono parzialmente scisse in frammenti che hanno una maggiore propensione a formare aggregati fibrillari di amiloide depositati sistemicamente, principalmente nel rene, nel fegato e nella milza. Nell'amiloidosi AA sistemica, i macrofagi vengono attivati ed elaborano pirogeni endogeni IL-1 e IL-6, che stimolano gli epatociti a sintetizzare e secernere SAA. Durante una reazione infiammatoria, l'SAA nel siero può aumentare di diverse centinaia di volte le concentrazioni normali. Tuttavia, non tutte le reazioni infiammatorie sistemiche portano alla formazione di amiloide AA, ma solo alcune delle reazioni infiammatorie portano all'amiloidosi. La deposizione di fibrille amiloidi insolubili si verifica sia a causa di un difetto dell'enzima di degradazione SAA nel sistema, sia in conseguenza della sintesi di proteina SAA anormale resistente alla degradazione enzimatica.

(Woldemeskel M. A concise review of amyloidosis in animals. Vet Med Int. 2012.)

L'amiloidosi come già riportato in medicina umana, è classificata in base alla classificazione clinica e al tipo di proteina amiloide coinvolta, con la forma AA come la più comunemente riportata nella malattia dell'amiloidosi felina. Sebbene siano state identificate 20-25 proteine con la capacità di aggregarsi e depositarsi nei tessuti sotto forma di amiloide, solamente 8 sono state documentate come precursori amiloidi. (C.

Ménsua, et al.) La forma famigliare è la causa più comune di amiloidosi AA, essa si riferisce alla deposizione, in organi e tessuti della proteina amiloide, questo è determinato dalla predisposizione genetica riconosciuta in determinate razze di gatti; ciò è ampiamente documentato nei gatti Abissini e Siamesi. (Zini et al.) L'alto grado di deposizione nel rene porta a insufficienza renale a giovane età, ma la progressione della malattia può manifestarsi, rapidamente, o progredire nell'arco di diversi anni; nonostante ciò, i depositi si verificano anche in altri organi e tessuti. (Chew et al., 1982)

Infatti, diversi rapporti sui gatti domestici a pelo corto e sulle razze non specifiche descrivono aspetti clinici e aspetti patologici della deposizione di amiloide renale o epatica. I casi possono manifestare morte improvvisa o con segni da intermittenti ad acuti di emorragia intra addominale; il coinvolgimento di altri organi può passare inosservato, rimanendo in una fase subclinica. (Zuber et al. 1997) Tra questi il rene risulta essere il principale organo colpito nel gatto Abissino, mentre la proteina amiloide si deposita principalmente nel fegato dei gatti siamesi. Il deposito di amiloide interrompe la funzione dell'organo del gatto; con insufficienza renale cronica nei gatti Abissini e insufficienza/emorragia epatica nelle razze siamesi (Zini et al.) che porta al fallimento di detti organi e alla morte. Troviamo inoltre, nei gatti anziani o diabetici, una particolare forma di amiloidosi insulare pancreatica. (Gruys e Timmermans, 1979; Yano et al., 1981) L'amiloidosi AA è stata invece, segnalata raramente nelle razze a pelo corto.

Tuttavia, in uno studio condotto su dei gatti, provenienti da tre diversi rifugi del nord Italia distanti ciascuno 100km dagli altri, deceduti prematuramente, è stato evidenziato un sorprendente 57-73% di animali con deposizione amiloide. Evidenziata tramite istopatologia post morte in fegato milza e reni. (Zini et al. AA-amyloidosis in cats (Felis catus) housed in shelters, 2022)

Per quanto concerne la forma AL, che, come abbiamo visto in precedenza, risulta essere la forma più diffusa nell'uomo, essa si presenta raramente negli animali domestici. (D. Y. Kim, et al. 2005) La forma di amiloide non-AA è stata invece riportata in due felini con timomi. (E. R. Burrough, et al.) La deposizione di AL-amiloide è stata segnalata in cani e gatti in associazione a plasmocitomi extramidollari diffusi e locali. (S. J. Platz et al. 1997) Negli animali la patogenesi di tale forma è conseguente alla sovrapproduzione delle catene leggere monoclonali associate alla discrasia immunocitica. Infatti, in questa forma,

vengono prodotte ad opera delle plasmacellule delle immunoglobuline con una caratteristica resistenza alla degradazione enzimatica e di conseguenza presenteranno una certa propensione alla formazione di fibrille insolubili. Contrariamente all'amiloidosi nell'uomo, in cui la maggior parte dei pazienti con AL non ha alcun linfocita B conclamato o neoplasia plasmacellulare, ma ha anticorpi monoclonali o catene leggere nel siero o nelle urine, le specie domestiche raramente hanno amiloide di tipo AL senza evidenza di una discrasia immunitaria. (P. W. Snyder, et al. 2007) La discrasia immunocitica, invece, più comune associata all'amiloidosi AL negli animali domestici è data da una neoplasia delle plasmacellule. (Woldemeskel M. A concise review of amyloidosis in animals. Vet Med Int. 2012.) La forma AL dell'amiloide può contenere catene leggere di immunoglobuline complete, la porzione terminale NH₂ delle catene leggere di immunoglobuline o entrambe. Le cellule secernenti immunoglobuline, i linfociti B e le plasmacellule sono associate alla deposizione di amiloide AL, che possono depositarsi nelle articolazioni e nei tessuti nervosi del felino, causando danni neurologici. (P. W. Snyder, et al. 2007)

1.3.2 Trasmissione

La trasmissione dell'amiloidosi AA, in alcune specie animali, avviene tramite un meccanismo di seeding-nucleation dipendente simile a un prione (Zini et al.) Tale meccanismo è stato dimostrato iniettando le fibre amiloidi AA, prelevate da organi patologici, conseguentemente la fase di latenza della malattia è stata notevolmente ridotta. (T. Murakami et al. Transmission of Systemic AA Amyloidosis in Animals, 2014)

Infatti, il “fattore di potenziamento dell'amiloide” responsabile dell'attività di accelerazione risulta essere lo stesso frammento di fibrilla AA. (Murakami T. et al. 2014) Inoltre, lo sviluppo dell'amiloidosi AA nei topi sembra essere accelerato dalla somministrazione orale di fibrille amiloidi estratte da esseri umani e bovini affetti, portando all'ipotesi di trasmissibilità interspecie. La presenza di amiloidi AA nelle feci dei ghepardi ha indicato una potenziale via di trasmissione oro-fecale in questa specie. (Zini et al.)

Per stabilire se la proteina amiloide AA contenuta nella frazione di fibrilla amiloide fecale fosse un requisito per l'attività di induzione dell'amiloide, la frazione amiloide è stata

immunodepleta con antisiero anti-ghepardo-AA. Esperimenti di controllo hanno mostrato che erano necessari cinque cicli di immunodeplezione per rimuovere le proteine AA dalla frazione fecale. Pertanto, le frazioni di amiloide fecale sono state esaurite cinque volte con l'antisiero anti-ghepardo AA o con le normali IgG di coniglio e sono state successivamente utilizzate per indurre l'amiloidosi AA nei topi.

L'immunodeplezione con l'antisiero anti-cheetah-AA ha impedito completamente l'attività di induzione dell'amiloide della frazione fecale di amiloide AA, perché nessun topo indotto soffriva di amiloidosi. Al contrario, cinque cicli di immunodeplezione con anticorpi IgG di coniglio normali hanno ridotto solo parzialmente l'attività di induzione dell'amiloide, che era associata solo a una perdita parziale della proteina amiloide AA. L'affidabilità del grado amiloide è stata confermata dall'analisi Western blot delle frazioni amiloidi isolate dalla milza dei topi (Fig. 5c). Questi risultati mostrano che i ghepardi affetti da amiloidosi AA passano la materia fecale che possiede attività di induzione dell'amiloide a causa della presenza della proteina della fibrilla amiloide AA. (Beiru Zhang et al. 2008)

1.3.3 Diagnosi

L'amiloidosi nei gatti è difficile da differenziare da altre malattie feline. L'insufficienza d'organo, l'infezione dell'organo e la malattia dei reni, del fegato, della milza e degli organi associati possono tutti simulare i segni clinici associati all'amiloidosi. Inoltre, l'amiloidosi è raramente segnalata in medicina veterinaria ed è meno probabile che sia la causa delle condizioni del felino rispetto alle comuni condizioni d'organo note per colpire i gatti. Tuttavia, l'amiloidosi può essere sospettata dal veterinario se il felino ha avuto un'infezione cronica. Inoltre, la maggior parte dei felini ricoverati in clinica veterinaria mostra già segni clinici, il che significa che i depositi di proteine amiloidi hanno già causato gravi danni all'organo del felino. I segni clinici diventano presto fatali e la diagnosi di amiloidosi viene spesso posta post-mortem. La biopsia rivelerà depositi di proteine amiloidi in uno degli organi colpiti come diagnosi di conferma.

Come già affermato in precedenza infatti la diagnosi definitiva di amiloidosi richiede l'identificazione istopatologica dei depositi di amiloide nei tessuti colpiti. Ciò è confermato dalla colorazione rosso Congo e dalla birifrangenza verde in luce polarizzata.

Si rende quindi necessario ed è l'oggetto di questo studio, la ricerca di un mezzo diagnostico: meno invasivo e utile a determinare la presenza della malattia per aumentare la possibilità di manipolare e curare gli animali in una fase iniziale della loro malattia, portando così ad una migliore assistenza sanitaria, al fine di migliorare il benessere animale.

Gli screening diagnostici di routine delle malattie infiammatorie coinvolgono comunemente la misurazione delle proteine della fase acuta sia nell'uomo (Gabay & Kushner, 1999), che negli animali (Cray et al., 2009). Il valore di uno screening è generalmente limitato, a meno che non sia possibile eseguire un esame clinico approfondito, che possa guidare la valutazione dei risultati.

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

2.1 Criteri di selezione dei casi

Il campione di questo studio retrospettivo è costituito da 29 gatti domestici a pelo corto provenienti da tre rifugi nel nord Italia, ciascuno a circa 100 km l'uno dall'altro; sono stati inclusi se erano morti spontaneamente o se erano stati soppressi a causa della gravità delle loro condizioni cliniche tra gennaio 2018 e luglio 2021.

Su questi animali è stata eseguita un'autopsia e un esame istopatologico su milza fegato e reni entro sei ore dalla morte. L'ultimo criterio di inclusione comprendeva la raccolta delle urine entro massimo 30 giorni antecedenti la morte; è stata quindi registrata sia la data del decesso che la data di raccolta del campione di urine. I dati relativi a sesso, età al ricovero, durata della degenza, causa del decesso, età al decesso e presenza di malattie concomitanti sono stati ricavati dalle cartelle cliniche. L'esame istopatologico ci ha permesso di distinguere i gatti con amiloidosi dai sani, per poi andare ad eseguire, sul campione di urine, esami di laboratorio standard e infine l'analisi proteomica.

2.2 Esame istopatologico

È stato eseguito un esame istologico per caratterizzare e classificare la presenza di amiloidosi su fegato milza e rene.

Per identificare la presenza del materiale amorfo sono state utilizzate le colorazioni Rosso Congo e potassio permanganato tramite osservazione con microscopio ottico, tale tecnica è risultata utile per caratterizzare e valutare la deposizione di amiloide.

Una volta diagnosticata la malattia, si è reso necessaria la tipizzazione dell'amiloidosi, andando a identificare la proteina amiloide-genetica alla base, attraverso l'immunoistochimica per confermare che si trattasse di SAA e non altri tipi di amiloidosi. Per quanto riguarda l'istologia del rene, è stato assegnato uno score in base alla deposizione di amiloide da 0 (assente), 1 (lieve) e 2 (moderato/grave).

Sempre in questo organo l'amiloidosi è stata suddivisa in base alla localizzazione in: glomerulare, interstiziale corticale/midollare, e vascolare.

Infine, per evidenziare i danni renali causati dai depositi, si è scelto di utilizzare il microscopio ottico, con le seguenti colorazioni: ematossilina/eosina, PAS (acido periodico - reattivo di Schiff), la colorazione tricromica di Masson e la PASM (periodic shiff- methenamine silver).

Questa metodica ci ha permesso di suddividere i danni renali in: glomerulosclerosi, nefrite interstiziale e danni tubulari; ai quali è stato assegnato uno score da 0 (assente), 1 (lieve) e 2 (moderato/grave).

2.3 Esami di laboratorio standard: PU/CU, SDS page elettroforesi urinaria, SAA/CU

La raccolta dell'urina è avvenuta entro i trenta giorni antecedenti alla morte mediante cistocentesi o free catch durante la visita. Innanzitutto, si è provveduto alla misurazione del peso specifico (USG) tramite un rifrattometro.

L'USG è influenzato dal numero di molecole nelle urine, nonché dal loro peso molecolare e dimensione; quindi, si avvicina solo alla concentrazione di soluto.

Di seguito (Tab. 2.1) si riportano i valori standard negli animali domestici:

Specie	Possible range	Usual range	“Adeguate”	“Inadeguate”
Cane	1.001- 1.065	1.015- 1.045	>1.030	< 1.030
Gatto	1.001- 1.085	1.035- 1.060	>1.040	< 1.040

Tabella 2.1: Valori e peso specifico standard

Successivamente sono state utilizzate delle strisce reattive (dipstick) che si basano sull' "errore proteico dei coloranti indicatori di pH". Fondamentalmente, il test dipende dalla capacità dei gruppi amminici nelle proteine di legarsi e alterare il colore degli indicatori acido-base, anche se il pH è invariato.

Queste prove colorimetriche ci hanno permesso di valutare la presenza di proteinuria, questo test tuttavia, non è in grado di distinguere tra proteinuria glomerulare (caratterizzata da proteine ad alto peso molecolare simile all'albumina 69Kd) e tubulare (mancato riassorbimento delle proteine in genere a basso peso molecolare).

È importante sottolineare che quando interpretiamo le proteine nelle urine, dobbiamo tenere conto di quanto è concentrata l'urina, valutando contemporaneamente il peso specifico dell'urina. L'urina normale contiene poche proteine; le reazioni negative alle tracce sono comuni nelle urine concentrate (peso specifico urinario > 1,025), sebbene si possano osservare rare reazioni più forti per le proteine (fino a 2+) in alcuni animali, con gravità specifica urinaria più elevata (>1,030). L'urina diluita (USG < 1,015) non dovrebbe contenere proteine nelle urine; quindi, anche una traccia di reazione 1+ in un'urina diluita indica un eccesso di proteine nelle urine e dovremmo cercare una causa. Una reazione all'astina > 2+ per le proteine nelle urine concentrate o diluite indica una proteinuria significativa.

La valutazione della proteinuria risulta essere di fondamentale importanza, per una diagnosi precoce di nefropatia negli animali domestici.

In questo studio si è deciso quindi di iniziare da questo dato per stabilire l'interessamento del danno renale e solo successivamente è stata rapportata con la creatinina.

Per una misurazione più accurata delle proteine nelle urine è stato utilizzato il rapporto tra proteine e creatinina (UPC). Questo misura la quantità di proteine in un campione di urina standardizzato alla concentrazione di creatinina.

La creatinina è un buon marcatore per questo scopo, perché è una piccola molecola che viene filtrata liberamente dal glomerulo e in genere non viene aggiunta all'urina o rimossa dall'urina dai tubuli, cioè nessun riassorbimento o secrezione. Ciò significa che, una volta filtrata, la sua concentrazione rimane abbastanza statica nelle urine, il che la rende un buon marker di standardizzazione del contenuto proteico.

Eseguiamo questa quantificazione o utilizziamo questo rapporto quando siamo preoccupati per la proteinuria che è in eccesso rispetto al peso specifico dell'urina e vogliamo determinare se l'eccesso di proteinuria è dovuto a una disfunzione tubulare o glomerulare.

Misurazione UPC nel gatto, un rapporto UPC inferiore a 0,5 indica una normale perdita proteica, tra 0,5 e 1 risulta essere dubbio, anormale se superiore a 1.

La proteinuria dovuta a danno tubulare può essere distinta dalla proteinuria dovuta a danno glomerulare eseguendo l'elettroforesi su gel sulle urine. Questo viene fatto utilizzando un'elettroforesi su gel di sodio-dodecil-solfato-poliacrilammide (SDS-PAGE).

Eseguiamo questa analisi per fornire una stima più quantitativa del numero di proteine nelle urine rispetto alla misura semiquantitativa fornita da un'analisi dipstick.

La proteina viene quantificata su un analizzatore chimico, che è più accurato rispetto all'utilizzo dell'astina di livello.

La proteinuria dovuta a danno tubulare può essere distinta dalla proteinuria dovuta a danno glomerulare eseguendo l'elettroforesi su gel sulle urine. Questo viene fatto utilizzando un'elettroforesi su gel di sodio-dodecil-solfato-poliacrilammide (SDS-PAGE) o un'elettroforesi su gel di SDS-agarosio.

L'SDS impartisce una carica uniforme alle proteine in modo tale che migrino di diverse lunghezze in una corrente elettrica in base alle dimensioni e non alla carica (a differenza dell'elettroforesi delle proteine sieriche o urinarie standard, che viene eseguita senza SDS e utilizzando un gel di agarosio o acetato di cellulosa).

Concludiamo il paragrafo parlando dell'amiloide urinaria, una proteina dell'infiammazione, che è stata rapportata alla creatinina (UAAC), confrontando i gatti AA positivi e negativi.

Per valutarne la presenza abbiamo utilizzato la metodica UASS VET SAA.

Il test di agglutinazione al lattice è un test eseguito in laboratorio per verificare la presenza di determinati anticorpi o antigeni, in questo caso ricercati nelle urine. Il campione è stato inviato in laboratorio, dove è stato miscelato con perline di lattice rivestite con un anticorpo o un antigene specifico. Se la sostanza ricercata (SAA) risultasse essere presente, le sfere di lattice si agglutineranno.

2.4 Analisi proteomica

▪ Protocollo preparazione campione per massa urine gatto aa

Il primo passaggio serve per aggregare e far precipitare le proteine con etanolo, semplicemente aggiungendo l'alcool al campione.

1- Precipitazione con EtOH

Aggiungere a 250 µl di campione 5 volumi di EtOH (1250 µl)

Agitare in ruota per 5'

Incubare O/N a -20°C

Il giorno dopo bisogna recuperare le proteine ed eliminare il surnatante, lasciando la provetta aperta sotto cappa, che essendo un alcool volatile evaporerà facilmente.

Centrifugare a 12000xg per 15' a RT

Rimuovere il surnatante e lavare con 1 ml di EtOH 70%

Centrifugare a 12000xg per 5' a RT

Rimuovere il surnatante e seccare sotto cappa

Risospendere in 20 µl di Urea 8M in Tris 100mM + AmBic (Ammonium Bicarbonate)

Quantificare con metodica Bradford

2- Riduzione, alchilazione, digestione

Aggiungere a 80 µg di proteine:

25 µl di AmBic

15 µl TFE (trifluoroethanol)

2,5 µl DTT (dithiothreitol)

Incubare 45' a 60°C

Aggiungere 10 µl IAM (iodoacetamide)

Incubare 1h al buio a RT

Aggiungere 2,5 µl DTT

Incubare 1h al buio a RT

Aggiungere

100 µl di AmBic

200 µl H₂O

Aggiungere 10 µl Tripsina [0,2 µg/ µl]

Incubare O/N a 37°C Il giorno dopo:

- bloccare la reazione con 2 µl di Acido Formico

3- Solid Phase Extraction (SPE) con Discovery DSC-18 solid phase extraction (Sigma)

Equilibrare le colonnine con 1 ml di ACN (acetonitrile)

Lavare con 2 ml di H₂O

Caricare il campione farlo passare nella colonnina

Lavare con 1 ml di H₂O

eluire con 800 µl di ACN 80%

Portare a secco

I peptidi sono stati infine analizzati tramite lo spettrometro di massa Orbitrap LC-MS Thermo Fisher Scientific. Tramite tale tecnica le proteine e i peptidi vengono portati in fase gassosa e poi ionizzate. Si misura poi il loro rapporto massa/carica osservato la differenza di accelerazione degli ioni quando viene applicato un campo elettrico. Successivamente i risultanti sono stati analizzati utilizzando il software MaxQuant per ottenere identificazioni e quantificazione. Analisi statistica è stata eseguita in automatico dal software del computer, eseguendo una serie di t d studente, confrontando i due gruppi e ripetendoli in serie.

CAPITOLO 3

Risultati

3.1 Segnalamento

Il campione era costituito da 29 gatti, tutti domestici a pelo corto; di questi 15 erano femmine castrate e 14 maschi sterilizzati.

Età (anni)	
MEDIA	8
MEDIANA	7 (1, 17)

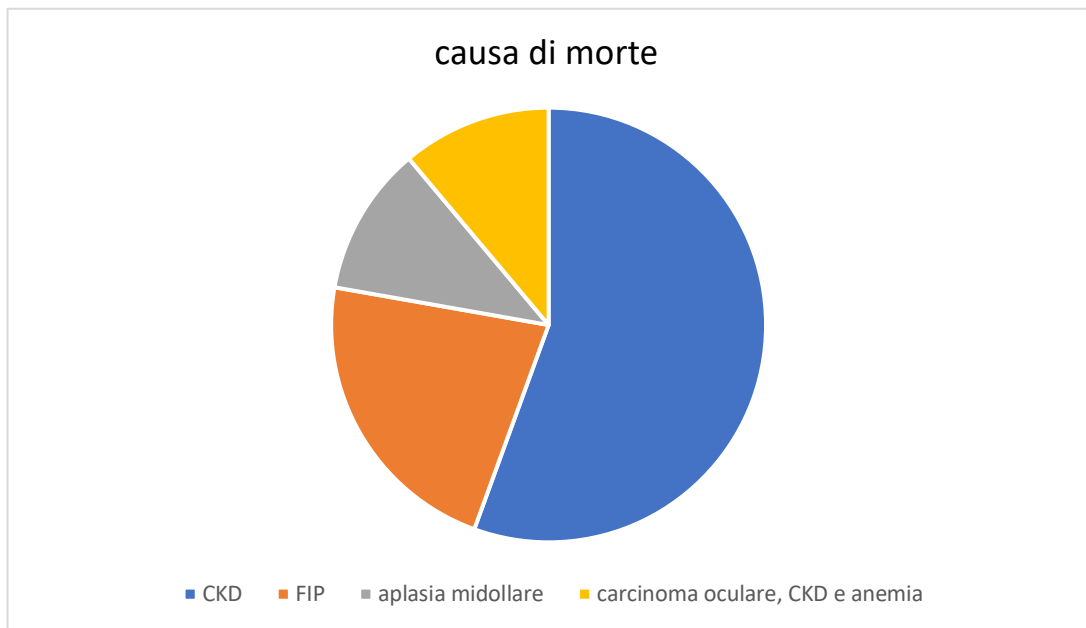
I gatti che sono risultati positivi all'amiloidosi renale AA erano 19, di questi 10 femmine e 9 maschi. Al momento della morte presentavano la seguente età:

Età (anni)	
MEDIA	8
MEDIANA	7 (1, 13)

3.2 Risultati istologico

Nel sottogruppo di gatti che presentavano amiloidosi AA, avevamo a disposizione la causa di morte di 9 pazienti su 19; di questi:

- 5 insufficienza renale cronica (CKD),
- 2 peritonite infettiva felina (FIP),
- 1 aplasia midollare,
- 1 carcinoma oculare, CKD anemia.

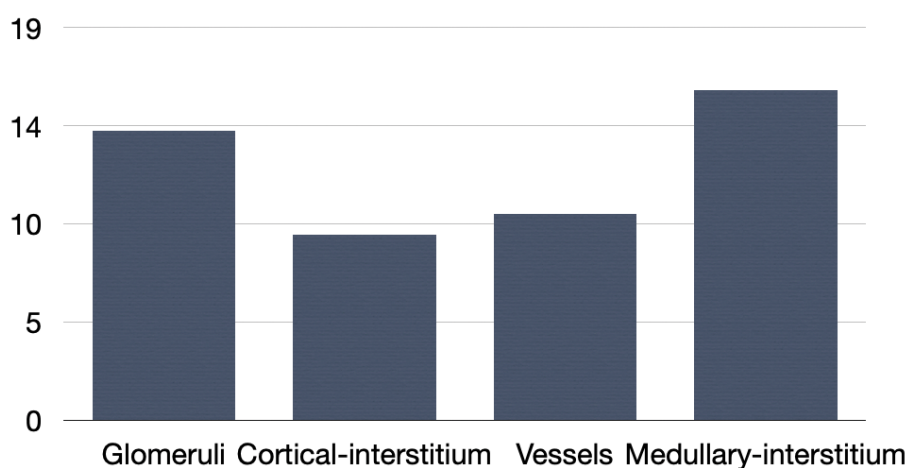


Dei 19 gatti che presentavano amiloidosi renale, 8 presentavano uno score lieve (1) e 11 moderato/grave (2). Di questi animali 15 presentavano una concomitante localizzazione nel fegato e 17 nella milza.

Score renale AA	
LIEVE (1)	8
MODERATA/ GRAVE (2)	11

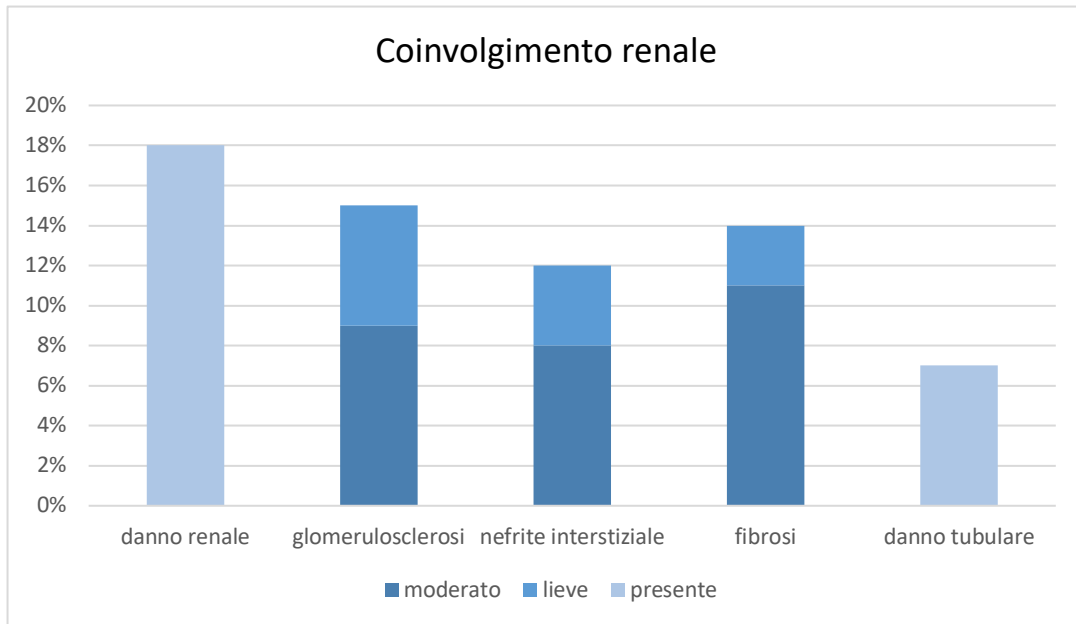
Concorrente localizzazione	
FEGATO	15/19
MILZA	17/19

Per quanto concerne la localizzazione renale risulta così suddivisa: 14 glomerulare, 10 vascolare, 9 interstizio corticale e 16 interstizio-midollare.



I risultati dell'istologico descrivono inoltre un danno renale in 18/19; con:

- 15 casi di glomerulosclerosi suddivisi in 9 moderata e 6 lieve,
- 12 casi di nefrite interstiziale suddivisi in 8 moderati e 4 lievi,
- 14 casi di fibrosi suddivisi in 11 moderati e 3 lievi,
- 7 casi di danno tubulare.



Per quanto riguarda la categoria di gatti che non presentava amiloidosi, essi risultavano suddivisi equamente in 5 maschi e 5 femmine; tutti sterilizzati e tutti sempre di razza domestica a pelo corto.

Al momento della morte presentavano la seguente età:

Età (anni)	
MEDIA	7
MEDIANA	6 (3, 17)

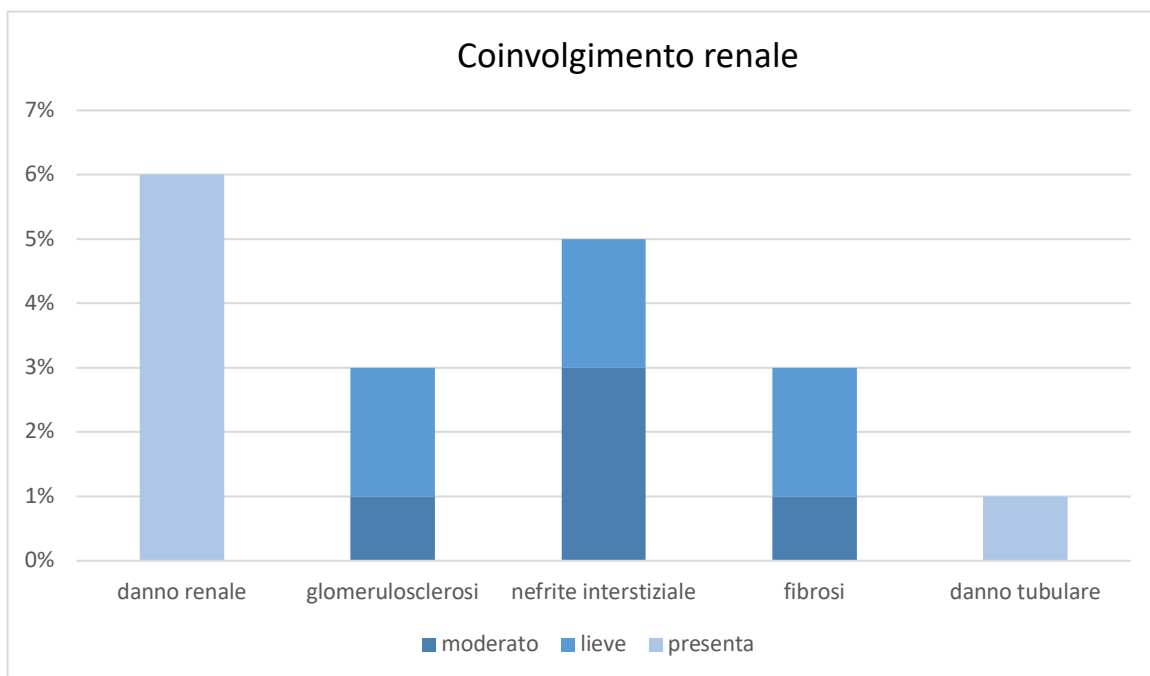
Nel sottogruppo di gatti che non presentavano amiloidosi AA la causa di morte era disponibile in 5 pazienti su 10, e di questi:

- 2 erano deceduti per CKD,
- 2 per linfoma,
- 1 per aplasia midollare.



I risultati dell'istologico hanno evidenziato, anche nel gruppo non-AA un danno renale in 6 casi su 10; con:

- 3/10 casi presentavano glomerulosclerosi suddivisi in 1 moderato e 2 lievi
- 5/10 casi presentavano nefrite interstiziale suddivisi in 3 moderati e 2 lievi
- 3/10 fibrosi suddivisi in 1 moderato e 2 lievi
- 1/10 evidenza di danno tubulare



3.3 Risultati analisi delle urine

Nel confronto tra gatti AA positivi e AA negati i risultati USG con i valori massimi, minimi e media (riportati di seguito) non risultavano significativi, infatti, come si può evincere il valore p risulta essere $p > 0,05$

USG	
media	1021,00
mediana	1016,00
range	1010,00
range	1050,00
p	0,357

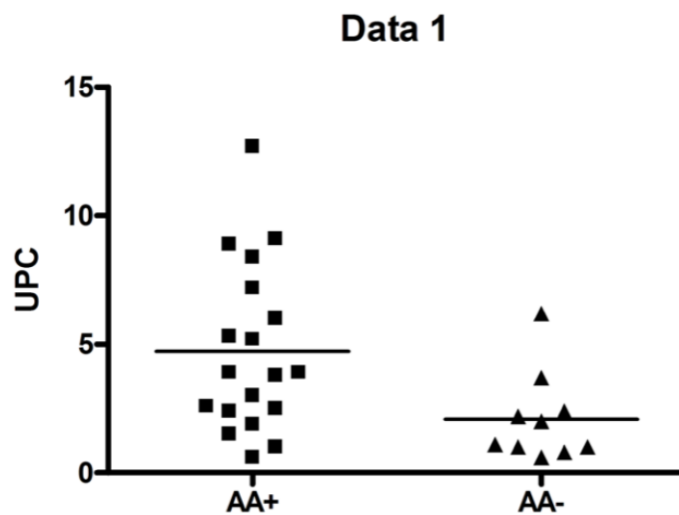
Per quanto riguarda il rapporto proteine urinarie creatinina (UPC) nel confronto tra AA vs non AA, i gatti malati presentavano un valore di UPC di 4,7, molto superiore rispetto ai sani in cui abbiamo trovato un valore di 2.1.

Come riportato nel grafico questa differenza è risultata statisticamente significativa.

UPC GATTI- NON AA	
MEDIA	2.1
MEDIANA (min, max)	1.5 (0.6 6.2)

UPC GATTI-AA	
MEDIA	4.7
MEDIANA (min, max)	3.9 (0.6 9.1)

Con un valore $p= 0.025$



L'esame elettroforesi urinaria ha riportato i seguenti risultati

PROTEINUIRA	GATTI-AA	GATTI-NON-AA
MISTA	17/19	6/10
GLOMERULARE	1/19	1/10
TUBULARE	1/19	1/10
ASSENTE	0/19	2/10

Confrontando i gatti AA positivi con deposizione glomerulare di amiloide con quelli che invece non la presentavano, si è notata una correlazione, infatti, i primi presentavano una proteinuria di tipo glomerulare di grave entità rispetto ai gatti senza deposizione glomerulare.

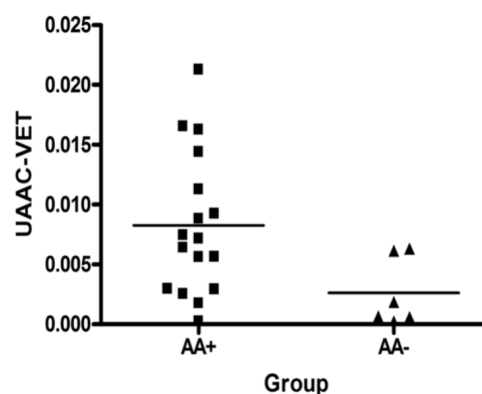
Come riportato nella seguente tabella. (P=0.0379)

	ASSENTE/LIEVE	MODERATA/GRAVE
AA GLOMERULARE	3	11
AA NON GLOMERULARE	4	1

Per concludere questo paragrafo vengono presentati i risultati relativi alla siero amiloide-A urinaria rapportata alla creatinina (UAAC); confrontando i gruppi AA+ e AA-.

Per valutare questa proteina dell'inflammazione è stata utilizzata la metodica SAA VET che ha riportato i seguenti risultati:

AA-cats UAAC	
Mean	8,3 x 10 ⁻⁴
Median (Min, Max)	7,2 (0,2, 21,2) x 10 ⁻⁴
Non-AA-cats UAAC	
Mean	2,6 x 10 ⁻⁴
Median (Min, Max)	1,3 (0,2, 6,3) x 10 ⁻⁴



Con valore $p=0.038700$

Dimostrando in maniera statisticamente significativa, che il gruppo di AA+ presenta una concentrazione maggiore.

3.5 Risultati proteomica

Attraverso la proteomica sono state identificate 1054 proteine, di queste, 63 sono risultate essere maggiori nei gatti AA+ e 62 invece sono risultate inferiori nei gatti AA-.

Di seguito si discuterà delle tre proteine, appartenenti al gruppo delle sovra espresse, ritenute più interessanti per ottenere un biomarker a fini diagnostici.

La scelta è stata basata sull'ipotetica fisiopatologia della malattia e sulle conoscenze in letteratura di altre malattie, il tutto per cercare di ridurre ad un range più contenuto di proteine.

Esse rientrano nella macrocategoria delle proteine dell'inflammazione e/o dello stress ossidativo e sono: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoforma X1, glutathione peroxidase 3 e ApoA-IV.

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoforma X1

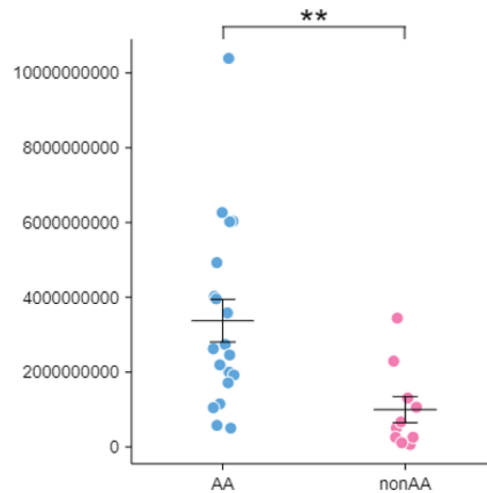


Figura 3.1: Concentrazione Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoforma X1 gatti AA e non AA

Gli inibitori dell' α -tripsina sono proteine del plasma costituite da 3-4 catene pesanti e una catena leggera che hanno la funzione di inibire le proteasi.

Tra le catene pesanti, quella definita H4, è una glicoproteina della fase acuta ed è prodotta principalmente dal fegato per poi essere secreta nel sangue e identificata nel siero.

L'isoforma X1 è nota anche come proteina correlata alla catena pesante della famiglia degli inibitori dell'inter- α -tripsina (IHRP).

tale struttura, è suddivisa in:

- catene pesanti H4 dell'inibitore dell'inter- α -tripsina da 35KDa
- catena pesante H4 dell'inibitore dell'inter- α -tripsina da 70KDa

Tale inibitore è labile al calore e, sottoponendolo al test Elisa, si può misurare il grado di disattivazione raggiunto.

Tale sostanza, ha un ruolo nella risposta infiammatoria⁽¹⁾

Come riportato nella figura 2 la concentrazione risulta maggiore nei gatti AA positivi.

Glutathione peroxidase 3

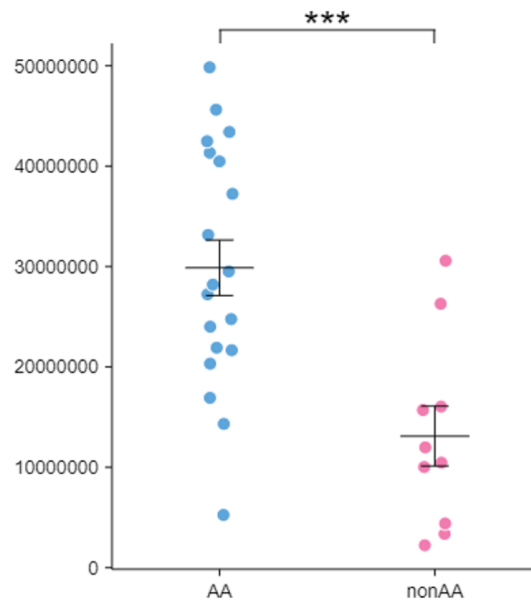


Figura 3.2: concentrazione Glutathione peroxidase 3 in gatti AA e non AA

Il termine Glutathione Perossidasi, indica una famiglia di enzimi che, grazie all'attività perossidasi, proteggono dal danno ossidativo⁽¹⁾ in quanto sono in grado di ridurre gli idroperossidi lipidici nella loro forma alcolica.

Contemporaneamente, riducono il perossido di idrogeno (H_2O_2) H_2O .

Si conoscono almeno 4 classi chiamate GPx1, GPx4, GPx2 e GPx3 che è particolarmente abbondante nel plasma.⁽²⁾

Nella loro reazione di riduzione degli idroperossidi, si servono di un catalizzatore che è il NADPH.

Sono molecole ricche di selenio e, proprio da tale composto, deriva l'attività antiossidativa.

È stato dimostrato che bassi livelli di glutathione perossidasi, sia nell'uomo che negli animali, contribuisce ad aumentare i processi di formazione dei radicali liberi e aumentano i processi infiammatori.

Come riportato nella figura 3 le concentrazioni risultano più elevate nei gatti AA positivi in maniera significativa.

ApoA-IV

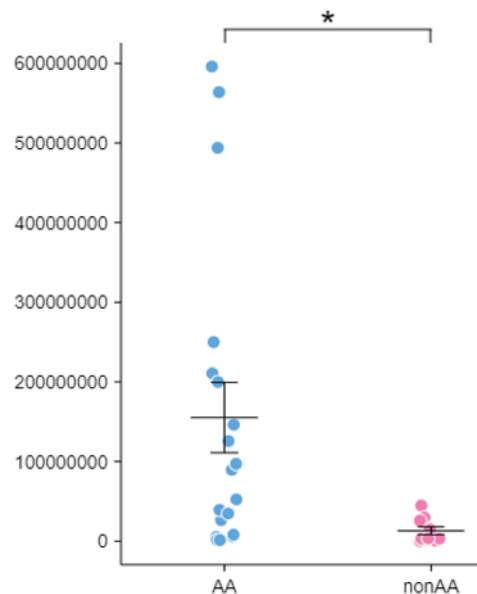


Figura 3.3: concentrazione ApoA-IV in gatti AA e non AA

Fa parte di una classe in cui si riconoscono cinque classi principali con relative sottoclassi. Ognuna di esse, è diversa per PM, associazioni ed eventuale funzione.

L'APO A-4, si associa ai chilomicroni e alle HDL e svolge 3 funzioni principali:

- contribuisce alla struttura delle lipoproteine
- regola l'attività degli enzimi partecipanti al metabolismo lipidico
- forma delle strutture dette "ligandi" per i recettori posti a livello endoteliale ed epatico

La struttura è caratteristica e, a livello della struttura secondaria, presenta sia alfa eliche che foglietti beta che permettono l'interazione con il nucleo idrofobo delle lipoproteine e anche di aggregarsi tra loro. ⁽¹⁾

È una proteina, comunque, che oltre ad essere coinvolta nel metabolismo delle lipoproteine, ha proprietà antiossidanti ed antinfiammatorie quindi, una sua diminuzione, gioca un ruolo fondamentale nella genesi del processo infiammatorio. Come riportato nella figura 4 la sua concentrazione risulta essere maggiore nei positivi rispetto ai sani.

CAPITOLO 4

Considerazioni conclusive

4.1 Analisi della popolazione

Analizzando la popolazione dello studio, si può notare che i gatti con AA al momento della morte presentavano un'età avanzata con una media di 8 anni, in linea con quanto ci si aspetterebbe da una malattia da accumulo.

Sia il campione di gatti positivi che quello dei negativi risultava equamente suddiviso tra maschi e femmine: 10 femmine e 9 maschi; e 5 femmine e 5 maschi rispettivamente.

Si può così desumere che la malattia colpisca senza prevalenze di sesso dell'animale.

4.2 Analisi istologico

L'analisi istopatologica ha permesso di determinare l'esatta localizzazione dell'amiloidosi AA: in linea con quanto riportato in letteratura, il principale organo coinvolto risulta essere il rene. Si è giunti a questa conclusione osservando che tutti i 19 gatti positivi presentavano un interessamento renale e, di questi, 11 presentavano uno score di danno renale moderato/grave e 8 lieve.

Una concorrente localizzazione ai danni di fegato e milza è stata riportata in 15 e 17 casi su 19 rispettivamente, sempre in linea con quanto già descritto in letteratura.

Il coinvolgimento renale ad opera della malattia è ulteriormente evidenziato dai seguenti dati:

- 15 casi di glomerulosclerosi, suddivisi in 9 moderata e 6 lieve;
- 12 casi di nefrite interstiziale, suddivisi in 8 moderati e 4 lievi;
- 14 casi di fibrosi, suddivisi in 11 moderati e 3 lievi;
- 7 casi di danno tubulare.

Essi dimostrano che i soggetti colpiti dall' AA risultano essere nefropatici, soprattutto se paragonati con i dati di coinvolgimento renale dei gatti AA negativi. Infatti, quest'ultimi presentavano un danno renale in 6 casi su 10:

- 3/10 casi presentavano glomerulosclerosi, suddivisi in 1 moderato e 2 lievi;
- 5/10 casi presentavano nefrite interstiziale, suddivisi in 3 moderati e 2 lievi;
- 3/10 fibrosi suddivisi in 1 moderato e 2 lievi;
- 1/10 evidenza di danno tubulare.

4.3 Analisi delle urine

In prima analisi sono stati valutati i valori di USG tra gatti sani e malati ma non sono state riscontrate differenze significative. Da ciò si evince che il peso specifico non è sufficiente, almeno nelle fasi iniziali della malattia, a emettere una distinzione tra i due gruppi.

È stato inoltre osservato che i valori di UPC risultavano statisticamente significativi, con una media di 4.7 nei gatti AA contro 2.1 nei gatti non AA, indicando quindi che i gatti malati sono più proteinurici rispetto ai sani.

Per distinguere il tipo di proteinuria è stato necessario ricorrere all'esame dell'elettroforesi urinaria SDS PAGE. Questo non ha evidenziato differenze significative tra gatti AA positivi e negati, tuttavia all'interno del gruppo AA+, suddividendolo ulteriormente in due sottogruppi, si è evidenziato in maniera significativa che i gatti con amiloidosi localizzata nel glomerulo presentavano una proteinuria glomerulare di maggiore entità.

	ASSENTE/LIEVE	MODERATA/GRAVE
AA GLOMERULARE	3	11
AA NON GLOMERULARE	4	1

La siero amiloide-A urinaria rapportata alla creatinina (UAAC) ha dimostrato una concentrazione superiore nei gatti AA+ rispetto ai gatti AA-. Risulta interessante notare che in letteratura, invece, non è stato documentato un suo aumento nel siero: in uno studio

eseguito sui topi, è stata indotta sperimentalmente l'AA somministrando alte concentrazioni di SAA, questa però è stata rapidamente incorporata nelle fibrille amiloidi, riducendo in maniera acuta la sua concentrazione circolante fino al 90%. (Paul Simons et al., 2013)

Il test UAAC ha dimostrato che, sebbene un gatto non presenti in circolo la proteina SAA, la malattia potrebbe essere comunque manifesta e, data la sua patogenesi, depositi di amiloide potranno essere ritrovati nei reni. Questo suggerisce che l'urina sia il substrato ideale per la ricerca di un biomarker.

Alla luce dei risultati ottenuti tramite gli esami di laboratorio standard (USG, UPC, SDS PAGE e UAAC) è stato evidenziato che i gatti con amiloidosi AA sono più nefropatici, proteinurici e presentano alterazioni con danni renali di maggiore entità rispetto ai gatti sani. Pertanto, questo dato evidenzia che l'amiloidosi è associata con un danno renale, anche se non possiamo dimostrare in modo inequivocabile una relazione di causa effetto, dal momento che lo studio è una *fotografia* statica e non dinamica poiché non sappiamo se il danno nei gatti AA+ fosse già presente prima dell'arrivo della malattia.

Sebbene tali esami abbiano permesso di discernere quanto fin qui evidenziato, l'insufficienza renale risulta solamente la naturale conseguenza del processo patologico operato dalla malattia. In aggiunta, i dati presentano un quadro sovrapponibile tra i due gruppi di gatti: sebbene in misura minore anche i gatti AA- presentavano danni renali, proteinuria e peso specifico elevato, rendendo quindi i suddetti test incapaci di emettere una diagnosi definitiva di amiloidosi.

4.4 Proteomica

Per riuscire a discriminare tra gatti AA+ e AA-, in uno stadio precoce della malattia e in una maniera non invasiva, è stata eseguita una biomarker discovery nei campioni di urine.

4.4.1 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoforma X1

L'inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoforma X1 è risultata aumentata in corso di amiloidosi AA.

Questa proteina, trovata attraverso la proteomica, è una glicoproteina plasmatica di fase acuta che tende ad aumentare in corso di infiammazione. Infatti, come dimostrato nel capitolo risultati la sua concentrazione risulta essere di gran lunga superiore nel gruppo di gatti AA+.

La sua funzione è quella di inibire le proteasi, enzimi che catalizzano la degradazione delle proteine. (Zhou et al. 2004). Le proteasi sono coinvolte nel processo di digestione della siero amiloide (SAA) quindi, dato la natura dell'inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 di aumentare negli stati infiammatori di natura cronica, quali ad esempio l'AA, questo meccanismo di inibizione potrebbe essere una concausa nella patogenesi e nello sviluppo dell'amiloidosi secondaria nei nostri animali domestici.

Tuttavia, data la sua natura, questa proteina tende ad aumentare in tutte le flogosi croniche, rendendola potenzialmente necessaria, ma non sufficiente, per emettere diagnosi definitiva di amiloidosi AA, soprattutto nelle fasi subcliniche della malattia.

4.4.2 Glutathione peroxidase 3

La Glutathione peroxidase 3 è risultata aumentata in gatti affetti da AA.

La proteina appartiene alla classe delle ossidoriduttasi. Tra le varie funzioni che svolge troviamo la regolazione del processo catabolico delle proteine proteasomali, ovvero quel processo che modula la velocità, la frequenza o l'entità delle reazioni chimiche risultanti nella rottura di una proteina o di un peptide, che avviene tramite l'idrolisi dei suoi legami peptidici mediata dal proteasoma (Uniprot).

Inibendo la via del proteosoma, uno dei sistemi che l'organismo mette in atto per degradare le proteine da ripiegamento errato, questa proteina potrebbe favorire l'accumulo di SAA.

I proteasomi sono complessi di proteasi ATP-dipendenti che degradano all'interno della cellula le proteine aberranti tramite reazioni di proteolisi. La mancata eliminazione delle proteine attraverso questo meccanismo genera l'accumulo di fibrille amiloidi.

In risposta agli stimoli infiammatori, gli stessi che possono portare a un'AA, e con il fine di proteggere l'organismo dai danni da stress ossidativo, la concentrazione della

Glutathione peroxidase 3 aumenta. Infatti, come evidenziato dai risultati di questo studio, la sua concentrazione risultava superiore nei gatti AA+ rispetto ai gatti AA-.

Questa osservazione non è però così significativa dal momento che questa proteina tende ad aumentare in tutte le flogosi croniche, rendendola potenzialmente necessaria, ma non sufficiente, per emettere diagnosi definitiva di amiloidosi AA (soprattutto nelle fasi subcliniche della malattia).

4.4.3 ApoA-IV

L'ApoA-IV è risultata aumentata nelle urine di gatti affetti da AA.

Le apolipoproteine sono costituenti proteici delle lipoproteine che trasportano colesterolo e grasso in circolo. Le apolipoproteine solubili possono dissociarsi transitoriamente dalla superficie delle lipoproteine in una forma libera labile che può ripiegarsi in modo errato, portando potenzialmente alla malattia amiloide. Il ripiegamento errato di ApoA-IV e la sierio l'amiloide A (SAA) provocano amiloidosi sistemiche. (Das e Gursky, 2015)

Simile ad altre apolipoproteine, la struttura dell'apoA-IV è composta principalmente da α -eliche. Una proprietà distintiva di apoA-IV è di possedere un dominio centrale globulare fiancheggiato dai segmenti N- e C-terminale, le cui interazioni regolano il legame lipidico (Walker et al. 2014).

Il dimero apoA-IV è quasi lineare, il che è coerente con la sua capacità di legare lipoproteine molto più grandi con una curvatura superficiale inferiore.

La modesta affinità di legame lipidico dell'apoA-IV è attribuita alle forti interazioni tra i suoi domini N- e C-terminale che mantengono la molecola proteica in una conformazione chiusa attraverso il cosiddetto "meccanismo di chiusura" (Deng et al. 2013; Walker et al. 2014).

Pertanto, nell'apoA-IV il principale segmento amiloidogenico è protetto dal ripiegamento errato tramite lo stesso meccanismo di "chiusura" che regola le interazioni proteina-lipidi. Inoltre, la presenza di due hot-spot amiloidi nei residui 7–16 e 40–41 aiuta a spiegare la deposizione del frammento N-terminale contenente questi residui nell'amiloidosi sistemica che coinvolge l'apoA-IV. (Bergström et al. 2004).

La peculiarità di questa proteina rispetto alle altre oggetto di studio è quindi di trovarsi sia nei depositi renali sia in circolo. Quest'ultima è risultata dallo studio eseguito tramite

proteomica, nel quale la concentrazione tra gatti AA+ risultava superiore rispetto ai gatti AA-,

La co-deposizione delle proteine con l'amiloide varia in base al sito di deposizione e al tipo di amiloide. Questo legame non dipende necessariamente dalla concentrazione proteica espressa nei tessuti; quanto piuttosto da altri fattori come pH, matrice extracellulare e proteoglicani (Jayaraman et al., 2017; Benseny-Cases et al., 2019).

Infatti, in uno studio eseguito su un campione di gatti con amiloidosi AA, l'immunoistochimica ha evidenziato la positività dell'ApoA-IV come principale "co-deposito" di amiloide a livello renale. (Amyloid Signature Proteins in Feline Amyloidosis S. Miyazaki et al. 2020)

I risultati di questo studio hanno quindi evidenziato che, sebbene l'inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoforma e la Glutathione peroxidase 3 aumentino drasticamente in corso di amiloidosi, suddetto evento, è dovuto alla patogenesi della malattia, data dalla sua componente infiammatoria.

Esse, a differenza dell'ApoA-IV, non vengono ritrovate nei depositi di amiloide a livello renale, suggerendo quindi che queste proteine aumentino solo come conseguenza e rendendole dei biomarker generici di infiammazione piuttosto che di amiloidosi AA.

L'ApoA-IV risulta invece la proteina più interessante da utilizzare come biomarker, come confermato in questo studio, infatti, l'AA tende a localizzarsi principalmente a livello renale e l'ApoA-IV, oltre a risultare nei depositi di amiloide renale, aumenta anche in circolo come dimostrato dalla proteomica.

In conclusione, alla luce dei dati emersi in questo studio, si suggerisce di proseguire con la validazione di tale proteina come biomarker urinario nella diagnosi di AA felina.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Ratrout JT, Satti MB. Primary localized cutaneous amyloidosis: a clinicopathologic study from Saudi Arabia. *Inter Dermatol* 1997;36(6):428–34.
- Ashutosh D Wechalekar, Julian D Gillmore, Philip N Hawkins, Systemic amyloidosis
- Asproni P, Abramo F, Millanta F, et al. Amyloidosis in association with spontaneous feline immunodeficiency virus infection. *J Feline Med Surg*. 2013;15(4):300–306.
- Barge-Caballero G, López-Bargiela P, Pombo-Otero J, Pardo-Martínez P. Quadriceps tendon rupture in wild-type transthyretin amyloidosis (ATTRwt). *Eur Heart J*. 2019;40(16):1307.
- Beatty JA, Barrs VR, Martin PA, Nicoll RG, France MP, Foster F, Lamb WA, Malik R (2002) Spontaneous hepatic rupture in six cats with systemic amyloidosis. *J Small Anim Practice* 43:355–363
- Benseny-Cases N, Karamanos TK, Hoop CL, Baum J, Radford SE (2019) Extracellular matrix components modulate different stages in b2-microglobulin amyloid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 294, 9392e9401.
- Benson MD, James S, Scott K, Liepnieks JJ, Kluve-Beckerman B. Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein. *Kidney Int* 2008; **74**: 218–22.
- Blunden AS, Smith KC. Generalised amyloidosis and acute liver haemorrhage in four cats. *J Small Anim Pract*. 1992;33(12):556–570.

- Chaudhuri TK, Paul S (April 2006). "Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches". *The FEBS Journal*. **273** (7): 1331–49

- Chiti F, Dobson CM (2006). "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease". *Annual Review of Biochemistry*. **75**: 333–66.

- Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Ann. Rev. Biochem.* 75, 333–366 (2006.)

- Clark, I. and Seawright, A.A.: Amyloidosis associated with chronic hypervitaminosis A in cats. *Austr. vet. J.* 44: 584 (1968). 13 CLARK, L. and SEAWRIGHT, A. A: Generalised amyloidosis in seven cats. *Path. vet.* 6: 117-134 (1969).

- Cooper CT, Greene BD, Fegan JE, Rovira D, Gertz MA, Marcus DM. External beam radiation therapy for amyloidosis of the urinary bladder. *Pract Radiat Oncol*

- Cui D, Kawano H, Takahashi M, et al. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. *Pathol Int.* 2002;52(1):40-45.

- Das 2015 - Amyloid-Forming Properties 8 of Human Apolipoproteins Sequence Analyses and Structural Insights.pdf

- Dember LM (December 2006). "Amyloidosis-associated kidney disease". *Journal of the American Society of Nephrology*. 17 (12): 3458–

- Deng X, Morris J, Chaton C, Schröder GF, Davidson WS, Thompson TB (2013) Small-angle X-ray scattering of apolipoprotein A-IV reveals the importance of its termini for structural stability. *J Biol Chem* 288(7):4854–4866

- Di Girolamo M, Monno D, Pirro MR, Nowakowski M. Approach to diagnosis in systemic amyloidosis: initial findings and time from symptoms onset to diagnosis (light-chain amyloidosis vs. transthyretin): problems and observations. *Amyloid*. 2011;18(suppl 1):83-85.

- Dominguez S, Wienberg P, Claros P, Claros A, Vila J. Primary localized nasopharyngeal amyloidosis. A case report. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996;36(1):61–7.

- Dominguez S, Wienberg P, Claros P, Claros A, Vila J. Primary localized nasopharyngeal amyloidosis. A case report. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1996;36(1):61–7.

- Dr.ssa Silvia Rossi, DVM Dipl. ECVCP – Dr.ssa Marta Attini, DVM; <https://www.biessea.com/lamiloidosi-nel-cane-e-nel-gatto/>

- Ebert EC, Nagar M (March 2008). "Gastrointestinal manifestations of amyloidosis". *The American Journal of Gastroenterology*. 103 (3): 776–787.

- Falk RH, Comenzo RL, Skinner M (September 1997). "The systemic amyloidoses". *The New England Journal of Medicine*. 337 (13): 898–909.

- Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, Fermand JP, Hazenberg BP, Hawkins PN, et al. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis, Tours, France, 18–22 April 2004. *Am J Hematol*. 2005;79(4):319–28.

- Gillmore JD, Hawkins PN. Pathophysiology and treatment of systemic amyloidosis. *Nat Rev Nephrol*. 2013

- Gruys E. Protein folding pathology in domestic animals. *J Zhejiang Univ Sci*. 2004;5(10):1226–1238.

- Hawkins, P.N.& Pepys, M.B. A primed state exists *in vivo* following histological regression of amyloidosis. *Clin. Exp. Immunol*. 81, 325–328 (1990).

- Hellman U, Alarcon F, Lundgren HE, Suhr OB, Bonaiti-Pellie C, Plante-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid* 2008; **15**: 181–86.

- Hjarre, A.: Uber das Vorkommen der Amyloiddegeneration bei Tieren. *Acta path. microbiol. scand.* 16: suppl., pp. 132-162 (1933).

- Holmgren G, Costa PM, Andersson C, et al. Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *J Med Genet* 1994; **31**: 351–54.

- Jacobson DR, Pastore RD, Yaghoubian R, et al. Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans. *N Engl J Med* 1997; **336**: 466–73.

- Jakob W. Spontaneous Amyloidosis of Mammals. *Veterinary Pathology*. 1971;8(4):292-306.

- Janssen, S, Elema, JD, van Rijswijk, MH, Limburg, PC, Meijer, S, Madema, E. Classification of amyloidosis: immunohistochemistry versus the potassium permanganate method in differentiation of AA from AL amyloidosis. *Appl Pathol* 1985; 3: 29–38.

- Jayaraman S, Gantz DL, Haupt C, Gursky O (2017); Serum amyloid A forms stable oligomers that disrupt vesicles at lysosomal pH and contribute to the pathogenesis of reactive amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 114

- Kazi, DS (2020). "Cost-Effectiveness of Tafamidis Therapy for Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Circulation*". *Circulation*. 141 (15): 1214.

- Kyle RA, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Localized AL amyloidosis of the colon: an unrecognized entity. *Amyloid*. 2003;10(1):36–41.

- Kyle RA, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Localized AL amyloidosis of the colon: an unrecognized entity. *Amyloid*. 2003;10(1):36–41.

- Larsen CP, Walker PD, Weiss DT, Solomon A. Prevalence and morphology of leukocyte chemotactic factor 2-associated amyloid in renal biopsies. *Kidney Int* 2010; **77**: 816–19.

- Lousada I, Comenzo RL, Landau H, Guthrie S, Merlini G. Light chain amyloidosis: patient experience survey from the amyloidosis research consortium. *Adv Ther*. 2015;32(10):920-928.

- M. A. Delaney, K. Singh, C. L. Murphy, A. Solomon, S. Nel, S. C. Boy Immunohistochemical and Biochemical Evidence of Ameloblastic Origin of Amyloid-Producing Odontogenic Tumors in Cats

- M. A. Gertz, "The classification and typing of amyloid deposits," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 121, no. 6, pp. 787–789, 2004.

- Mathis, M.: Un cas de degenerescence amyloïde chez un chat. *J. Med.*, Lyon 12: 310-314 (1887).

- Mawby DI, Whittemore JC, Donnell RL. Fatal pulmonary haemorrhage associated with vascular amyloid deposition in a cat. *JFMS Open Rep.* 2018;4(2): doi: 10.1177/2055116918817993.

- Ménsua C, Carrasco L, Bautista MJ, et al. Pathology of AA amyloidosis in domestic sheep and goats. *Vet Pathol.* 2003;40(1):71–80.

- Merlini G, Dispenzieri A, Sanchirawala V, Schönland SO, Palladini G, Hawkins PN, Gertz MA (October 2018). "Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis". *Nature Reviews. Disease Primers.* 4 (1): 38

- Muller FL., Lustgarten MS, Jang Y., Richardson A., Van Remmen H (agosto 2007) "Tendenze nella teoria dell'invecchiamento ossidativo "Biologia e medicina radicali liberi. 43(4): 477-503. Doi: 10.1016/J.freeradbio med. 2007.03.034. PMID 17640558

- Murakami T, Ishiguro N, Higuchi K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals. *Vet Pathol.* 2014;51(2):363–371.

- Murphy C, Wang S, Kestler D, et al. Leukocyte chemotactic factor 2 (LECT2)-associated renal amyloidosis. *Amyloid* 2011; **18** (suppl 1): 223–25.

- Muthukumar K., Nachiappan V. (dicembre 2010) “Lo stress ossidativo indotto dal cadmio “. *Giornale indiano di biochimica e biofisica*. 47(6):383-7. PMID 21355423

- Paltrinieri S, Sironi G, Giori L, et al. Changes in serum and urine SAA concentrations and qualitative and quantitative proteinuria in Abyssinian cats with familial amyloidosis: a five-year longitudinal study (2009–2014). *J Vet Intern Med*. 2015;29(2):505–512.

- Pathogenetic mechanisms of amyloid A amyloidosis by J. Paul Simons,a,b,1 Raya Al-Shawi,b Stephan Ellmerich,a 2013

- Pathologic basis of Veterinary Disease. James F. Zachary, M. Donald McGavin. 6th Edition, Elsevier, 2017

- Pepys, M. B. Amyloidosis. *Annu. Rev. Med.* 57, 223–241 (2006).

- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al.; International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12): e538–48.

- Recalde D., Ostos M.A., Badell E., et al., Apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines. *Biol.* 24(4) (2004) 756-761

- Reilly MM, Staunton H, Harding AE. Familial amyloid polyneuropathy (TTR ala 60) in North West Ireland: a clinical, genetic, and epidemiological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; **59**: 45–49.

- S. Miyazaki, A. Kadota, I. Mitsui, T. Murakami, Amyloid Signature Proteins in Feline Amyloidosis, *Journal of Comparative Pathology*, Volume 177, 2020, Pages 10-17.

- S. Miyazaki*, A. Kadota I. Mitsui† and T. Murakami* Spontaneously arising disease Amyloid Signature Proteins in Feline Amyloidosis 2020

- Segev G, Cowgill LD, Jessen S, et al. Renal amyloidosis in dogs: a retrospective study of 91 cases with comparison of the disease between Shar-Pei and Non-Shar-Pei dogs. *J Vet Intern Med.* 2012;26(2):259–268.

- Soto C, Estrada L, Castilla J (March 2006). "Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates". *Trends in Biochemical Sciences*. **31** (3): 150–5.

- Sousa A, Coelho T, Barros J, Sequeiros J. Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-type I in Póvoa do Varzim and Vila do Conde (north of Portugal). *Am J Med Genet* 1995; **60**: 512–21.

- Takahashi N, Glockner J, Howe BM, Hartman RP, Kawashima A (May 2016). "Taxonomy and Imaging Manifestations of Systemic Amyloidosis". *Radiologic Clinics of North America*. 54 (3): 597–612.

- Takahashi N, Glockner J, Howe BM, Hartman RP, Kawashima A (May 2016). "Taxonomy and Imaging Manifestations of Systemic Amyloidosis". *Radiologic Clinics of North America*. 54 (3): 597–612.

- Walker RG, Deng X, Melchior JT, Morris J, Tso P, Jones MK, Segrest JP, Thompson TB, Davidson WS (2014) The structure of human apolipoprotein A-IV as revealed by stable isotope-assisted cross-linking, molecular dynamics, and small angle x-ray scattering. *J Biol Chem* 289(9):5596–5608

- Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN (June 2016). "Systemic amyloidosis". *Lancet*. 387(10038): 2641–2654.

- WHO-IUIS, Nomenclature Sub-Committee, “Nomenclature of amyloid and amyloidosis,” *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 71, no. 1, pp. 105–112, 1993.

- Zhang B, Une Y, Fu X, et al. Fecal transmission of AA amyloidosis in the cheetah contributes to high incidence of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(20):7263–7268.

- Zhuo L., Hascall VC., Kimata K. (settembre 2004). “Inibitore dell’inter- α -tripsina, un complesso covalente proteina-glicosaminoglicano-proteina” *J.Biol. Chimica*. 279(37) -82. Doi: 10.1074/JbcR300039200. PMID 15151994

RINGRAZIAMENTI

Vorrei dedicare questo spazio a chi, con dedizione e pazienza, ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato.

Un ringraziamento particolare va al mio relatore Zini che mi ha seguito, con la sua infinita disponibilità, in ogni step della realizzazione dell'elaborato, fin dalla scelta dell'argomento.

Ringrazio di cuore i miei genitori. Grazie per avermi sempre sostenuto e per avermi permesso di portare a termine gli studi universitari.

Ringrazio gdp per avermi trasmesso la sua immensa forza e il suo coraggio. Grazie per tutto il tempo che mi hai dedicato.

Grazie ai miei amici Dido e Gara per essere stati sempre presenti e per aver ascoltato i miei sfoghi.

Ringrazio Casa Chiara Marti Michela e Ale per tutti i momenti fantastici passati insieme con il “gruppone”

Grazie anche a Rachele e Anna per i momenti di spensieratezza con la regola del “45+45+10”.

Grazie a tutti i miei colleghi di corso in particolare alle “Ricapitolando”: Tyna, Sofia, Carlotta, Martina, Graziana (Giovanna) Laura e Fausta per avermi sempre incoraggiato fin dall'inizio del percorso universitario.

Un ringraziamento particolare ai miei fedeli compagni di studio: Enrico, Lisa, Maria e Laura

E infine grazie ai miei coinquilini Sami Luca e Raul per le giornate di studio, e le serate passate insieme; un periodo che porterò sempre nel cuore.

