

IL PROCESSO DI CHERATINIZZAZIONE E CORNEIFICAZIONE CUTANEA DEL CANE.

Parte I: ASPETTI BIO-MORFOLOGICI

LUCA MECHELLI, LUISA PASCUCCI

*Istituto di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria
Università degli Studi di Perugia*

Via S. Costanzo n. 4 - 06100 Perugia - Telefono 075/5854537, Fax 075/5854538

Riassunto

Le patologie della cheratinizzazione e corneificazione cutanea rappresentano uno dei capitoli più interessanti della dermatologia veterinaria moderna. La presenza di scaglie cutanee localizzate o diffuse è infatti una delle condizioni dermatologiche di più frequente riscontro nella clinica dei piccoli animali.

Le cause responsabili della formazione di scaglie cutanee sono assai numerose e di difficile differenziazione eziopatogenetica.

Un corretto approccio diagnostico e terapeutico non può prescindere dalla conoscenza dei meccanismi con cui si realizzano normalmente i processi di cheratinizzazione e corneificazione cutanea e dei numerosi fattori che li modulano.

Scopo del nostro lavoro è quello di proporre, da un lato, un'analisi il più possibile dettagliata dei fenomeni biomorfologici che si realizzano nel corso del processo di cheratinizzazione e corneificazione cutanea (parte I), dall'altro, l'indicazione di una classificazione anatomo-clinica delle malattie scagliose cutanee del cane attraverso l'individuazione di alcuni elementi eziopatogenetici fondamentali (parte II).

Summary

Cutaneous keratinization and cornification diseases represent one of the most interesting chapters of modern Veterinary Dermatology. Cutaneous diffused or localized scales, in fact, are one of the most common dermatological lesions observed in the practice of small animals.

The causes of cutaneous scaling, are very numerous and difficult to differentiate etiopathogenetically. At the same time, clinical-pathological aspects of scaling diseases appear various and convoluted.

A correct diagnostic and therapeutic approach consists in understanding the mechanisms that normally carry out keratinization and cornification processes and the numerous factors that regulate them.

Our main aim is to propose, on one hand, the most detailed analysis of the bio-morphological phenomena that are carried out during cutaneous keratinization and cornification processes (part I) and, on the other hand, an anatomical-clinical classification of canine cutaneous scaling diseases based upon some fundamental etio-pathogenetical elements (part II).

INTRODUZIONE

L'epidermide rappresenta lo strato di rivestimento esterno della cute. Tale struttura è costituita da un epitelio pavimentoso pluristratificato cheratinizzato privo di vasi, nel quale il nutrimento raggiunge le cellule diffondendo dal letto capillare dermico attraverso la membrana basale.^{1,2,3,4}

I cheratinociti che la costituiscono soggiacciono ad un complesso fenomeno differenziativo che consente alle cellule dello strato basale, dotate di attività germinativa, di lasciare le porzioni profonde dell'epidermide per raggiun-

gere quelle più superficiali sotto forma di elementi cheratinizzati desquamanti.⁴

Il tempo necessario all'intero processo di maturazione cheratinocitaria viene indicato essere, per i cani di razza Beagle, di circa 22 giorni.^{4,5,6} Durante questo periodo le cellule modificano totalmente gli elementi strutturali e funzionali di cui sono costituite, per divenire dei corpi desquamanti anucleati, interamente cheratinizzati, indicati con il termine di corneociti.^{4,7}

Numerosi fattori possono intervenire nel controllo di questo processo, alcuni accentuando i fenomeni proliferativi del comparto germinativo, altri incrementando quelli

differenziativi degli strati soprabasali.⁴

Prima di individuare gli eventi legati all'azione di questi agenti e gli aspetti clinico-dermatologici che li caratterizzano, riteniamo utile riferire brevemente alcuni concetti fondamentali di bio-morfologia cutanea con particolare riguardo ai processi di cheratinizzazione e corneificazione.

BIO-MORFOLOGIA CUTANEA: EPIDERMIDE

Nell'epidermide è possibile distinguere diverse tipologie cellulari (Fig. 1):

1. cheratinociti: rappresentano il 90% circa delle cellule epidermiche e costituiscono pertanto la componente strutturale fondamentale. La loro morfologia varia in relazione alla fase maturativa in cui si trovano ed il loro ciclo si esaurisce normalmente nell'arco di tre settimane.¹

2. cellule dendritiche: costituiscono il 10% circa delle cellule epidermiche, sebbene non appartengano ad elementi di origine ectodermica. Si caratterizzano per la presenza di proiezioni citoplasmatiche ramificate (dendriti) e per l'assenza di strutture di legame con le altre cellule epiteliali.^{1,9}

Possono essere così classificate:

2.a Cellule di Langerhans (3-8%): svolgono un ruolo fondamentale nell'ambito della risposta immunitaria locale ("APC" - "cellule presentanti l'antigene"). Queste cellule, infatti, non sono cellule "residenti" epidermiche, ma hanno la capacità di migrare verso le strutture linfoidi regionali per svolgere i compiti immunologici di loro competenza.^{1,9,10} La loro osservazione in microscopia ottica è possibile soltanto con l'uso di tecniche immunocitochimiche. Il microscopio elettronico consente di osservare all'interno del citoplasma alcune strutture peculiari quali i granuli di Birbeck, con una particolare morfologia a "racchetta da tennis". Queste strutture, presenti costantemente nell'uomo, non sono tuttavia sempre osservabili nel cane.^{1,9,10}

2.b Melanociti (2 - 4%): cellule derivanti dalla cresta neurale e responsabili della sintesi di melanina. I melanociti si trovano per lo più a livello dello strato germinativo epidermico e nella porzione bulbare dei follicoli piliferi. Il rapporto melanocita/cheratinocita varia con il variare della pigmentazione del soggetto, con un valore medio che si aggira intorno a 1:20.^{1,4,10,11}

2.c Cellule di Merkel: sono cellule dendritiche confinate a livello dello strato basale di alcune regioni del corpo, dove svolgono il ruolo di mecano-recettori. Appartengono al sistema neuroendocrino diffuso (APUD) e nel loro interno sono presenti granuli neurosecretori citoplasmatici.^{1,11}

In base alle caratteristiche morfo-funzionali, l'epidermide offre a considerare un compartimento germinativo (strato basale), in cui non è rara l'osservazione di figure mitotiche, ed un compartimento di differenziazione o post-mitotico (strato spinoso, granuloso e corneo).⁸

In alcune regioni del corpo (ad es. i cuscinetti plantari) è presente anche un quinto strato, detto *strato lucido*, in grado di conferire una certa capacità impermeabilizzante alla struttura epidermica (Foto 1).^{9,10}

STRATO BASALE E MEMBRANA BASALE

Lo strato basale rappresenta la porzione germinativa dell'epidermide ed è costituito da elementi di forma cilindrica o cubica, con asse maggiore perpendicolare alla membrana basale, nucleo rotondeggiante od ovalare piuttosto voluminoso e basofilia marcata. Tali cellule appaiono spesso eterogenee: alcune di esse sono "dentellate" e fortemente ancorate alla giunzione dermo-epidermica, altre sono "non dentellate" e rappresentano gli elementi con maggior potenziale proliferativo.^{1,4,8,10}

Le cellule dello strato basale sono saldamente ancorate alla membrana basale, una struttura interposta tra le cellule epidermiche e lo stroma connettivale del derma alla cui sintesi partecipano sia i cheratinociti che i fibroblasti. La membrana basale, oltre a rappresentare un supporto meccanico per l'epidermide, ne modula la crescita e la differenziazione e ne regola gli scambi metabolici con il derma. Il suo spessore è di circa 40-60 nm ed è visibile al micro-

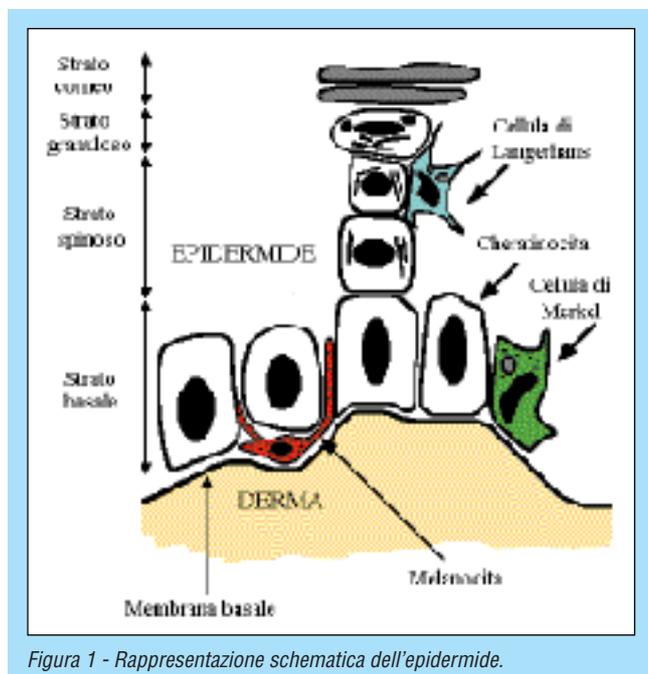


Figura 1 - Rappresentazione schematica dell'epidermide.

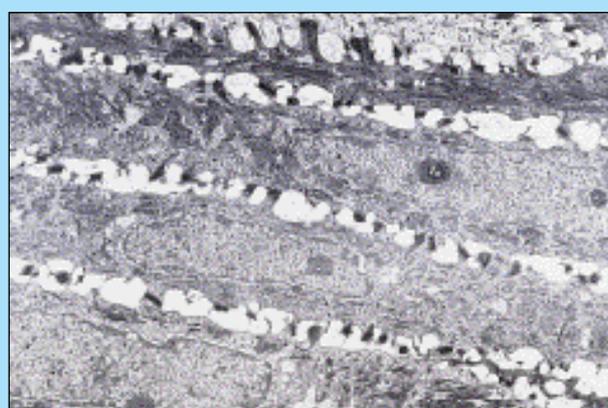


Foto 1

scopio ottico mediante l'uso di particolari tecniche di colorazione (P.A.S.).^{1,4,12}

Tramite indagini ultrastrutturali è possibile individuarne gli strati fondamentali:

- Lamina lucida
- Lamina densa
- Sub-lamina densa

Nell'ambito di questa complessa struttura è possibile descrivere un numero cospicuo di costituenti molecolari dei quali vengono ricordati quelli maggiormente rappresentati:

a) *componenti fondamentali* quali, il collagene di tipo IV, espresso soltanto nelle membrane basali, la laminina di tipo 1, il nidogeno, i proteoglicani (perlecano, condroitin

solfato, eparan solfato) ed il collagene di tipo V, coinvolti principalmente nella costituzione della lamina densa^{4,12,13};

b) *proteine fibrillari di ancoraggio*, rappresentate dalla fibronectina, dal complesso epiligrina-calina-niceina (BM600 o laminina di tipo 5), dalla unceina e dalla laminina di tipo 6 (o k-laminina), responsabili dell'ancoraggio dell'epitelio alla membrana basale^{4,13};

c) *fibrille di ancoraggio*, costituite da collagene di tipo VII, che connettono la sub-lamina densa, di cui sono i principali costituenti, alle placche di ancoraggio del derma sottostante. Linchina e tenascina sono due costituenti minori (Fig. 2).^{4,13,14}

La superficie basale delle cellule germinative è ancorata alla membrana basale attraverso particolari strutture giunzionali, gli emidesmosomi, che hanno come sede di attacco il collagene di tipo IV della membrana stessa.^{4,8}

La Tabella 1 elenca le componenti principali della membrana basale ed il tipo cellulare (cheratinocita o fibroblasto) coinvolto nella loro sintesi.

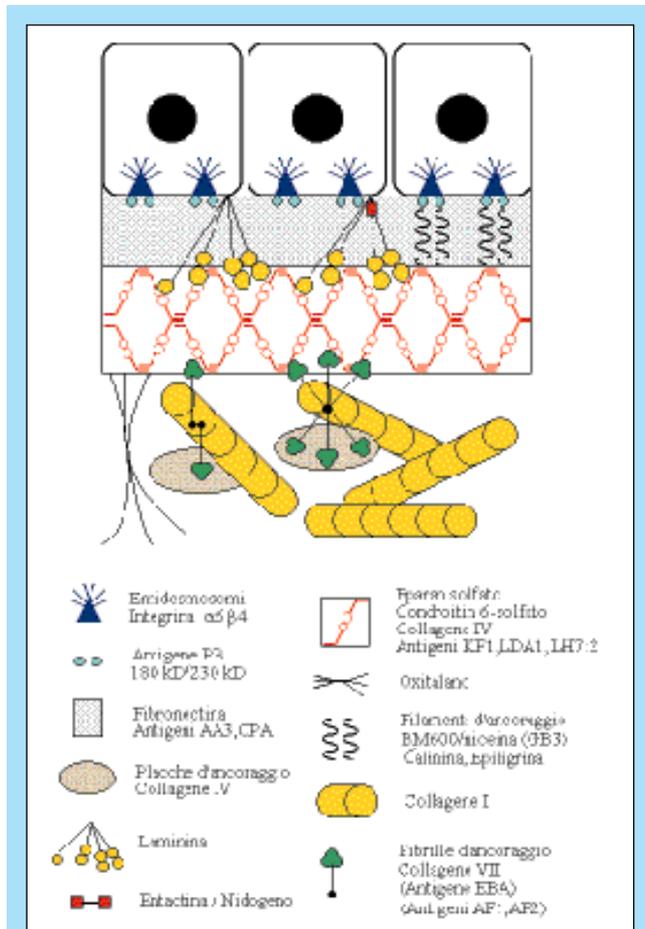


Figura 2 - La giunzione dermo-epidermica.

STRATO SPINOSO

Rappresenta il primo degli strati soprabasali ed è costituito da un numero di piani cellulari variabile (da uno a quattro) con cellule poliedriche, leggermente eosinofile e legate le une alle altre da numerosi desmosomi (aspetto "spinoso" all'osservazione microscopica). Il citoplasma appare più voluminoso di quello delle cellule basali, il contenuto in tonofilamenti è maggiore e gli organuli citoplasmatici sono più numerosi.^{1,8} Rispetto ai cheratinociti basali, queste cellule mostrano nel loro citoplasma nuove strutture:

- *Corpi lamellari* (cheratinosomi, "membrane coating granules" o "corpi di Odland"): rappresentano strutture granulari sintetizzate dalle cellule spinose e granulose. Questi elementi discoidali, costituiti da materiale prevalentemente lipidico (fosfolipidi, glicosfingolipidi, steroli liberi, enzimi idrolitici e ioni calcio), verranno liberati negli spazi intercellulari superiori per formare un complesso lamellare pericellulare. Questo complesso, nello strato corneo, svolgerà un importante compito di barriera e di regolazione del processo di desquamazione.^{1,4,8}

- *Granuli cheratoialini*: questi granuli, contenuti nelle cellule spinose e granulose, rappresentano la sede di stoccaggio della profillagrina, precursore inattivo della fillagrina.

- *Precursori dell'envelope corneificato*: si tratta di proteine che, come vedremo più avanti, vengono polimerizzate nel corso della maturazione epidermica per l'intervento dell'enzima transglutaminasi.^{4,13}

STRATO GRANULOSO

È costituito da due o tre piani di cellule caratterizzate dalla presenza di numerosi corpi lamellari sottomembranosi e di granuli cheratoialini.^{1,8}

Le cellule granulose assumono una forma modicamente appiattita, con asse maggiore parallelo alla superficie epidermica. Nel punto di transizione tra lo strato granuloso e lo strato corneo i corpi lamellari si aggregano in clusters e si fondono con la membrana plasmatica riversando il loro

Tabella 1
Principali costituenti molecolari della membrana basale e cellule di origine

	Cheratinociti	Fibroblasti
Laminina	+	+
Fibronectina	+	+
Collagene IV e VII	+	+
Collagene V	n.c.	+
Unceina	+	n.c.
Perlecano	+	n.c.
Eparan e Condroitin-solfato	+	+

n.c.: non conosciuta.

contenuto nello spazio intercellulare.^{8,13}

In prossimità del nucleo e a livello della membrana plasmatica, infine, sono presenti depositi omogenei elettron-densi che contengono alcuni precursori proteici dell'envelope corneificato.⁸

STRATO CORNEO

Rappresenta lo strato più superficiale dell'epidermide ed è costituito da diversi piani di cellule (corneociti) che possono essere più o meno numerosi a seconda della regione anatomica considerata e che aderiscono reciprocamente mediante i corneodesmosomi e la matrice lipidica intercellulare.

La transizione fra lo strato granuloso e lo strato corneo è caratterizzata da una serie di trasformazioni che iniziano con la lisi dei nuclei e degli organuli citoplasmatici.³

I corneociti sono cellule anucleate, estremamente appiattite, con un citoplasma occupato da un complesso fibro-amorfo costituito da filamenti di cheratina immersi in una matrice densa, delimitato da una spessa parete detta envelope corneificato. Questa struttura membranosa, contrapposta alla faccia interna della membrana plasmatica, evidenzia due porzioni fondamentali: una interna proteica ed una esterna costituita da lipidi complessi.^{1,8}

Nelle porzioni più superficiali dello strato corneo il protoplasma viene definitivamente degradato e la coesione intercellulare scompare, consentendo la realizzazione del fenomeno desquamativo.⁸

STRUTTURE GIUNZIONALI CELLULARI

Si tratta di strutture specializzate in grado di garantire una coesione adeguata tra cellula e cellula e tra cellula e matrice extracellulare. La loro presenza è fondamentale per il mantenimento del normale assetto dell'epidermide, per la regolazione del processo di migrazione e maturazione dei cheratinociti, nonché per l'esfoliazione dei corneociti. L'adesione intercheratinocitaria o cheratinocitario-connettivale (membrana basale) si realizza mediante l'azione di due categorie principali di sistemi di connessione:

1) Emidesmosomi e Adesioni Focali, responsabili dell'ancoraggio dei cheratinociti dello strato germinativo alla membrana basale (*adesione cellula-matrice extracellulare*);¹³

2) Desmosomi e Giunzioni Aderenti, responsabili dell'adesione intercheratinocitaria nei diversi strati epidermici (*adesione cellula-cellula*).¹³

Gli emidesmosomi ed i desmosomi sono strutture di adesione stabili, mentre le adesioni focali e le giunzioni aderenti sono responsabili di un'adesione solo transitoria. Il loro numero, infatti, risulta significativamente aumentato nel corso del processo di cicatrizzazione delle ferite.¹³

Tutti i tipi di giunzione sono costituiti da una porzione recettoriale transmembranaria e da una placca citoplasmatica in connessione con il citoscheletro cellulare. Quest'ultimo è rappresentato da *filamenti intermedi*, nel caso di emidesmosomi e desmosomi e da *filamenti di actina* nel caso delle adesioni focali e delle giunzioni aderenti.¹³

Alla costituzione molecolare delle strutture di giunzione partecipano due famiglie di molecole di adesione, le **integrine** e le **caderine**, le quali svolgono un ruolo fondamentale regolando il processo di crescita e differenziazione epidermica, condizionando la formazione di strutture di giunzione e determinando la polarità cellulare.¹³

Le **integrine** sono molecole eterodimeriche in grado di influenzare alcune attività biologiche cellulari (migrazione, proliferazione, secrezione, etc.) grazie alla loro connessione con il citoscheletro.¹³

A livello epidermico, le integrine sono espresse in maniera prevalente sulla superficie basale delle cellule dello strato germinativo e, in quantità molto più modesta, sulla loro superficie laterale ed apicale. Questa localizzazione, insieme al tipo di substrati a cui si legano (collagene IV, laminina 1, laminina 5, nidogeno, fibronectina), suggerisce per le integrine il ruolo di recettori coinvolti in legami *eterotipici* (cioè tra cellula e matrice extracellulare) e, in misura molto minore, *omotipici* (cellula-cellula).¹³

Le **caderine** sono proteine calcio-dipendenti, coinvolte in legami di tipo *omofilico* ed *omotipico* (la caderina posta sulla superficie di una cellula si lega ad una molecola identica posta sulla cellula adiacente).¹⁵ Le caderine sono connesse al citoscheletro dei cheratinociti attraverso una molecola intermedia, la *catenina*, che permette la trasmissione di segnali all'interno del citoplasma.¹⁵

ADESIONE CELLULA-MATRICE EXTRACELLULARE

1.a Emidesmosomi

Gli emidesmosomi sono situati sulla superficie basale delle cellule germinative ed ancorano queste cellule alla membrana basale sottostante.⁴

Tra i numerosi costituenti degli emidesmosomi, quelli di maggior interesse nello studio delle malattie autoimmuni bollose sono: la placoglobina, l' $\alpha 6\beta 4$ - integrina, l'antigene del pemfigoide bolloso di tipo I (BFAg I) e di tipo II (BFAg II o collagene XVII), la plectina e la proteina associata ai filamenti intermedi (IFAP 300).⁴

1.b Adesioni Focali

Sono strutture giunzionali di piccole dimensioni localizzate lungo la superficie basale delle cellule dello strato germinativo e responsabili di un legame per lo più transitorio.¹³

ADESIONE CELLULA-CELLULA

2.a Desmosomi

Sono le strutture fondamentali del contatto intercellulare grazie a cui viene assicurata la coesione fra elementi di tipo epiteliale e la continuità funzionale tra i filamenti intermedi di cellule epiteliali adiacenti.

Pur essendo istologicamente evidenziabili soprattutto negli strati soprabasali (strato spinoso e granuloso), i desmosomi sono presenti, in numero e costituzione variabile, a livello di tutti gli strati epidermici.¹³

A livello dello strato corneo i desmosomi sono ancora presenti e sembrano responsabili della forte adesione che esiste tra i corneociti degli strati più profondi.

Nel punto di transizione tra strato granuloso e strato

corneo, i desmosomi si arricchiscono di una nuova proteina, la *corneodesmosina*, in grado di proteggere i desmosomi dalla degradazione.¹³

Nella loro costituzione possono essere individuate tre frazioni principali³:

a) una frazione citoplasmatica (placca desmosomiale o placca d'adesione) su cui s'inseriscono i filamenti di cheratina. Questa placca è una struttura densa di 15-20 nm inserita nel foglietto interno della membrana plasmatica e costituita da proteine non glicosilate;

b) una frazione transmembranaria, costituita prevalentemente da proteine glicosilate;

c) una frazione extracellulare, la *desmoglea* o *core*, costituita dalla porzione glicosilata delle proteine transmembranarie.

I filamenti di cheratina presenti nel citoplasma dei cheratinociti non sono ancorati direttamente alla placca di adesione. Esiste infatti una zona intermedia detta "satellite" in cui si trovano le *catenine* (α , β , γ), proteine calcio-dipendenti responsabili di mediare il legame tra i filamenti intermedi di cheratina e le proteine di placca (Figg. 3 e 4).^{3,7}

2.b Giunzioni Aderenti

Sono particolari strutture di adesione intercellulare che permettono la coesione di cellule adiacenti attraverso un legame calcio-dipendente dei filamenti di actina.⁴

Le componenti proteiche coinvolte nella formazione di questo tipo di giunzione appartengono alla famiglia delle caderine e possono essere distinte in proteine transmembranarie e proteine intracellulari.⁴

PROCESSO DI MATURAZIONE DEI CHERATINOCITI

Il complesso delle modificazioni che si realizzano nell'ambito della popolazione cheratinocitaria epidermica

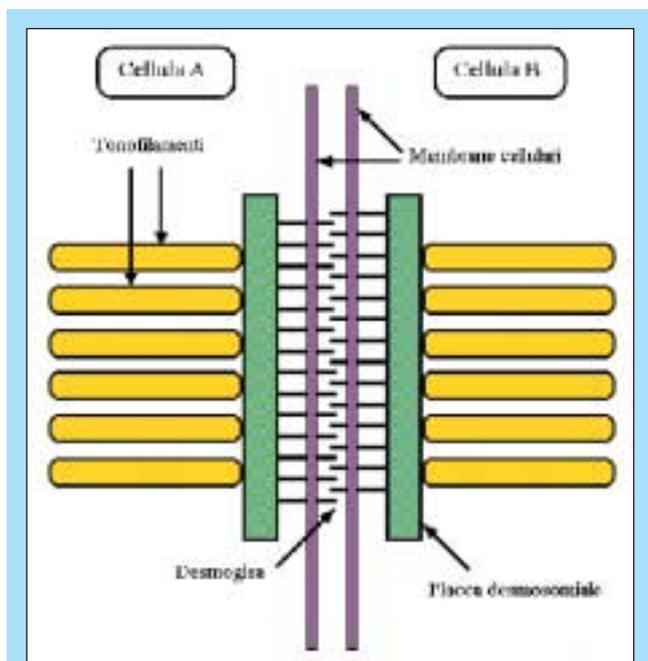


Figura 3 - Struttura del desmosoma.

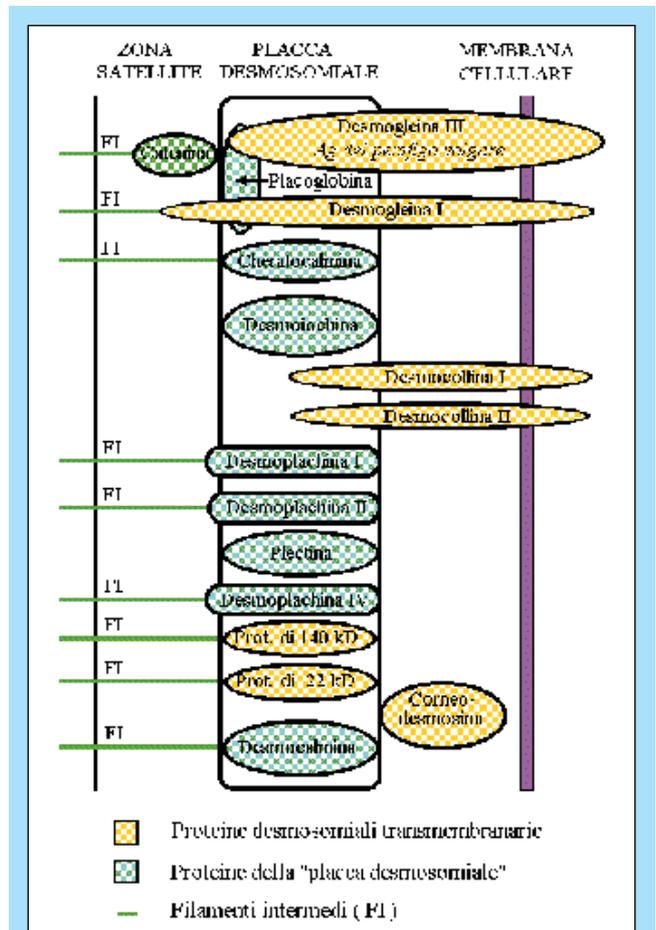


Figura 4 - Proteine costituenti il desmosoma.

durante la differenziazione cellulare può essere suddiviso in tre momenti fondamentali: proliferazione (A), differenziazione (B), desquamazione (C).¹⁸

A. PROLIFERAZIONE

Le cellule dell'epidermide mostrano un continuo rinnovamento legato all'attività mitotica delle cellule basali. In condizioni di normalità, gli eventi proliferativi sono in equilibrio con quelli desquamativi.¹

I fattori che esercitano un'azione di modulazione sulla proliferazione epidermica possono essere individuati in due tipi fondamentali e cioè quelli ad azione stimolante e quelli ad azione inibente, come indicato nelle Tabelle 2a e 2b.^{4,18} Va comunque ricordato che, la maggior parte di essi, svolge la propria azione biologica in relazione alla concentrazione con cui è presente.¹³

Interleuchine (IL-1 e IL-6)

Sono molecole fondamentali nell'attivazione della flogosi ed in particolare nei fenomeni chemiotattici leucocitari.

L'IL-1 (IL-1 α ed IL-1 β) promuove la proliferazione dei cheratinociti e dei fibroblasti, svolgendo anche un'azione chemiotattica nei confronti dei primi nel corso di fenomeni riparativi cutanei.^{4,19,20} La sua sintesi appare aumentata in seguito a stimoli di varia natura (es. radiazioni ultraviolet-

Tabella 2a

Fattori che *stimolano* la proliferazione delle cellule basali

CITOCHINE:

- EGF (Epidermal Growth Factor)
- TGF- α (Transforming Growth Factor- α)
- Anfiregulina
- IGF I e IGF II (Insulin-like Growth Factor)
- KGF (Keratinocyte Growth Factor)
- b-FGF (basic-Fibroblast Growth Factor)
- GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor)

INTERLEUCINE:

- IL 1 α
- IL 6
- IL 8

Acido retinoico a basse concentrazioni (10^{-7} - 10^{-10} M)

ATP (Adenosintrifosfato)

Acido Arachidonico e suoi metaboliti

- Ac.idrossieicosatetraenoico
- Leucotrieni
- Prostaglandine
- Trombossani

Ca⁺⁺ extracellulare a basse concentrazioni

Tabella 2b

Fattori che *inibiscono* la proliferazione delle cellule basali

Caloni epidermici

TGF- β - 1 (Transforming Growth Factor- β -1)

Interferon α -like protein

Vitamina D₃

Acido retinoico ad elevate concentrazioni (10^{-6} M)

Ca⁺⁺ ad elevate concentrazioni

Glicocorticoidi

lette), mentre risulta inibita dalle prostaglandine (PGE₂ e PGI₂).

L'IL-6 è prodotta in piccole quantità dai cheratinociti normali, ma la sua sintesi risulta aumentata in seguito a stimolazione da parte di IL-1 e radiazioni ultraviolette.¹³

Citochine

Le citochine sono sostanze polipeptidiche che interagiscono con i recettori cellulari per il controllo di numerose attività e per l'attivazione della risposta infiammatoria locale.

Queste molecole, che possono esprimersi attraverso un'azione mitogena sulle cellule basali epidermiche, agiscono incrementando la sintesi di DNA, la produzione di RNAm e la sintesi proteica oppure intensificando la migrazione dei cheratinociti e quindi la loro proliferazione nel comparto germinativo (Epidermal Growth Factor e Transforming Growth Factor- α).¹³

L'**Epidermal Growth Factor (EGF)** è una citochina in grado di incrementare la captazione epidermica di sostan-

ze nutritive, in modo particolare di calcio, e di incentivare la liberazione di acido arachidonico dalle membrane cellulari.²¹ Questo fattore di crescita, che induce una evidente iperplasia epidermica, si osserva in concentrazioni notevolmente superiori alla norma nella psoriasi dell'uomo.^{4,19,20}

Recenti studi hanno tuttavia dimostrato che l'azione dell'EGF è di tipo bifasico: a concentrazioni elevate, infatti, è in grado di inibire la proliferazione e di indurre stati di differenziazione aberranti.¹³

Allo stesso recettore dell'EGF si legano anche il **Transforming Growth Factor- α (TGF- α)** e l'**Anfiregulina**, due citochine sintetizzate dai cheratinociti che svolgono un'azione regolatrice autocrina sulla proliferazione epidermica. Con l'EGF condividono una struttura ed una funzione per lo più simili.¹³

L'**Insuline-like Growth Factor (IGF I e IGF II)** è prodotto principalmente dai fibroblasti dermici in seguito a stimolazione da parte del Platelet-derived Growth Factor (PDGF). Il legame dell'IGF I con il suo recettore posto anche sui cheratinociti, determina un incremento delle mitosi attraverso l'attivazione del recettore dell'EGF.¹³

L'azione dell'IGF I sui cheratinociti rappresenta uno dei meccanismi di regolazione della crescita epidermica da parte del tessuto connettivo dermico.¹³

Il **Keratinocyte Growth Factor (KGF)** è una citochina sintetizzata dai fibroblasti dermici.

Oltre all'azione mitogena svolta sui cheratinociti, il KGF sembra coinvolto in un meccanismo di controllo volto a proteggere i cheratinociti da una differenziazione prematura, soprattutto nel corso dei processi riparativi cutanei. Esperienze condotte sia *in vitro* che *in vivo*, hanno infatti consentito di osservare che l'assenza di KGF o una sua bassa concentrazione inducono lo sviluppo di un'epidermide gravemente atrofica, caratterizzata da attività proliferativa ridotta e da uno squilibrio tra proliferazione e differenziazione che si manifesta con presenza di cellule differenziate già a livello basale o immediatamente soprabasale.¹³

Il **basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF)** è un fattore di crescita sintetizzato dai cheratinociti che stimola la loro proliferazione attraverso un'azione mitogena.¹³

Il **Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)** è una molecola che regola la proliferazione e la differenziazione delle cellule emopoietiche, che promuove la proliferazione cheratinocitaria *in vitro* e che sembra favorire i processi riparativi cutanei.¹³

Transforming Growth Factor - β (TGF - β)

Il TGF - β è sintetizzato dai cheratinociti soprabasali. Ad elevate concentrazioni induce l'espressione di K6 e K16, le cheratine tipiche dei processi iperproliferativi cutanei.¹³

Caloni epidermici

Sono molecole poco caratterizzate dal punto di vista biochimico che svolgono un'azione inibente sulla crescita cheratinocitaria ed una contemporanea stimolazione della

differenziazione cellulare.

Alcuni fattori quali l'Interferon α - like protein sintetizzata dai cheratinociti, apparterebbe a questa categoria.¹³

Glicocorticoidi

I glicocorticoidi inducono la sintesi di una proteina detta lipomodulina o macrocortina, in grado di stabilizzare la membrana citoplasmatica attraverso l'inibizione della fosfolipasi A_2 . Questa particolare azione biologica ne giustifica spesso l'utilizzo nella terapia dei disordini scagliesi iperproliferativi cutanei.¹⁸

Acido arachidonico ed eicosanoidi

L'acido arachidonico è un acido grasso insaturo ed un costituente fondamentale della membrana citoplasmatica di molti tipi cellulari, tra cui i cheratinociti.

Rappresenta il substrato della fosfolipasi A_2 , enzima in grado di innescare la così detta "cascata dell'acido arachidonico", cioè una serie di eventi biochimici che conduce alla formazione di diversi mediatori infiammatori (eicosanoidi) quali prostaglandine, leucotrieni, trombossani.¹⁸

Alcune di queste molecole di derivazione (prostaglandina E-2, prostaglandina F2- α , leucotriene B-4, 12-HETE o acido 12-idrossieicosatetraenoico), si comportano anche da mediatori dell'attività mitotica e quindi della proliferazione cellulare epidermica.¹⁸

L'attivazione della fosfolipasi A_2 , all'origine di questa catena di fenomeni biochimici, consegue all'azione di agenti fisici (es. radiazioni UV- β) e chimici (ac. retinoico, istamina, bradichinina, calcio, etc.).¹⁸

Retinoidi

L'azione svolta dal retinolo e dai suoi derivati sembra essere dose e specie dipendente, ma in generale, basse concentrazioni stimolano la proliferazione delle cellule basali epidermiche, mentre elevate concentrazioni la inibiscono.¹³

Dal punto di vista terapeutico, i retinoidi sembrano in grado di "normalizzare" il processo di maturazione epidermica; tale effetto, tuttavia, potrebbe essere indiretto e derivare da una induzione del TGF - β .¹³

Calcio

Il calcio in forma ionica non è uniformemente distribuito all'interno dell'epidermide; la sua concentrazione extracellulare aumenta man mano che ci si muove verso gli strati più superficiali.⁴

Utilizzando colture cellulari di cheratinociti, è stato possibile osservare che a basse concentrazioni di calcio i cheratinociti si organizzano in un monostato senza mostrare alcun segno di differenziazione (non si formano desmosomi e non viene sintetizzata transglutaminasi). Elevate concentrazioni di calcio, al contrario, inducono un incremento della differenziazione cellulare con sintesi dei precursori

di dell'envelope, esocitosi dei corpi lamellari, attivazione della transglutaminasi, espressione delle cheratine K1 e K10 (e non delle K5 e K14), sintesi di strutture giunzionali con conseguente stratificazione delle cellule e formazione di un epitelio composto.^{4,18,22,23,24,25}

Adenosintrifosfato (ATP)

L'ATP è la principale molecola coinvolta nel trasporto di energia in forma chimica.

L'ATP extracellulare è in grado di legarsi a recettori situati sui cheratinociti promuovendone la proliferazione in sinergia con altri fattori. Nel cane è in grado di produrre anche un incremento del calcio ionizzato intracellulare, con conseguente induzione della differenziazione dei cheratinociti.^{4,26}

Vitamina D3

Secondo studi recenti, la vitamina D₃, nella sua forma attiva, inibirebbe la proliferazione dei cheratinociti favorendone i processi di differenziazione.^{4,27} Quest'azione è associata con la riduzione della sintesi di DNA.¹³

Influenza dei fibroblasti dermici sulla crescita dei cheratinociti

I fibroblasti dermici influenzano la proliferazione e la differenziazione dei cheratinociti attraverso diversi meccanismi:

- sintetizzano e degradano le proteine della matrice extracellulare;
- sintetizzano le fibre collagene;
- producono fattori di crescita come il b-FGF e l'IGF I.¹³

B. DIFFERENZIAZIONE

La differenziazione delle cellule epidermiche è un processo di maturazione continuo ed irreversibile che, dai cheratinociti basali, porta alla formazione dei corneociti.⁷

Durante questo processo i cheratinociti subiscono numerose modificazioni morfologiche e biochimiche che possono essere così riassunte:

- a) sintesi di numerosi tipi di cheratine nelle diverse tipologie cellulari in differenziazione;
- b) diversa organizzazione dei filamenti di cheratina nei vari strati cellulari;
- c) sintesi di particolari proteine per la costituzione dell'envelope corneificato, quali l'involucrina, la loricrina, la cheratoialina e di enzimi come la transglutaminasi;
- d) espressione diversificata di molecole di adesione nei vari piani cellulari.⁴

Il processo di differenziazione si realizza attraverso due momenti fondamentali: la sintesi e l'aggregazione della cheratina da un lato e la formazione dell'envelope corneificato dall'altro.¹⁸

B.1 SINTESI ED AGGREGAZIONE DELLA CHERATINA

Le cheratine rappresentano la componente strutturale principale dei cheratinociti e sono presenti in tutti gli strati epidermici.⁸

Organizzate in tonofilamenti, le cheratine appartengono alla classe dei filamenti intermedi (8-10 nm di diametro) e, con i microfilamenti di actina (6 nm) ed i microtubuli (23 nm), costituiscono il citoscheletro di tutte le cellule epiteliali.^{3,4}

Chimicamente, sono proteine fibrose con struttura α -elicoidale che possono essere suddivise in due tipologie principali:

- cheratine di tipo I, acide, comprendenti il gruppo K10 - K20; sono le più leggere, con p.m. di 40-56,5 kD;
- cheratine di tipo II, basiche, comprendenti il gruppo K1 - K9; sono le più pesanti, con p.m. di 52-67 kD.^{8,28,29}

La struttura secondaria dei polipeptidi e l'organizzazio-

ne strutturale dei filamenti intermedi di cheratina è complessa ed ancora, in parte, controversa.³

La differenziazione epidermica si accompagna a modificazioni quali-quantitative della loro espressione intracellulare (30% delle proteine nelle cellule basali, 85% nei corneociti), con un progressivo aumento della densità dei tonofilamenti e con modificazioni chimico-fisiche particolarmente evidenti a livello dello strato corneo.³

Infatti, l'espressione delle cheratine varia in funzione del grado di maturazione delle cellule epidermiche, con i cheratinociti basali che contengono cheratine del tipo K14 (50 kD) e K5 (58 kD) mentre, negli strati soprabasali, compaiono cheratine basiche del tipo K1 (67 kD) e K2 (65 kD) e cheratine acide del tipo K10 (56,5 kD) e K11 (56 kD), indicate come cheratine terminali (Fig. 5).^{8,19,28,30}

Queste proteine fibrose elicoidali sono responsabili del mantenimento della integrità strutturale cellulare ed operano in favore delle comunicazioni intercellulari attraverso le strutture desmosomiali.¹⁸

Mentre i filamenti di actina e le strutture microtubulari cellulari sono presenti nella gran parte dei tessuti, le cheratine mostrano una spiccata epitelio-specificità che può raggiungere una connotazione antigenica ulteriore in base al tipo di epitelio, al grado di differenziazione cellulare ed al suo stato fisiologico.⁴

In corso di iperplasia epidermica le cellule epiteliali esprimono spesso la presenza di cheratine atipiche del tipo K6 e K16, assenti nei cheratinociti normali (Tab. 3).⁴

L'analisi immunostochimica delle cheratine risulta di fondamentale importanza per lo studio di malattie scagiose iperproliferative cutanee. Queste proteine, a motivo della variabilità che le contraddistingue e per la loro peculiare localizzazione, rappresentano dei markers fondamentali nello studio della differenziazione cheratinocitaria e nella identificazione di precise tipologie neoplastiche epiteliali.^{18,31,32}

Nello strato granuloso vengono "attivate" alcune proteine fondamentali alla differenziazione cellulare, quali la fillagrina e la transglutaminasi, che consentono ai cheratinociti intermedi di trasformarsi in corneociti. A tale proposito è importante ricordare come, a questa maturazione

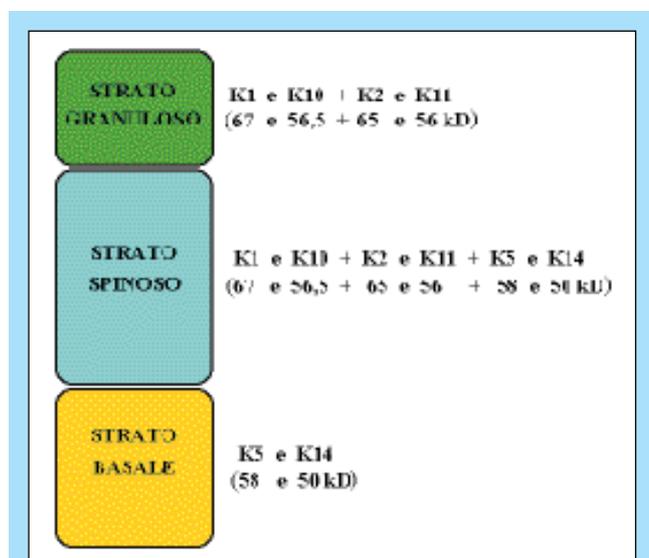


Figura 5 - Distribuzione delle cheratine dei diversi strati di cellule epidermiche normali.

Tabella 3
Distribuzione dei vari tipi di cheratine nei tessuti

TIPI DI CHERATINE	LOCALIZZAZIONE
K1 e K10	Cellule soprabasali dell'epidermide normale
K2 e K11	Cellule più superficiali dello strato spinoso
K3	Cornea
K4 e K13	Epitelio esofageo
K5 e K14	Cellule basali dell'epitelio pavimentoso pluristratificato
K6 e K16	Cellule soprabasali di epiteli iperplastici
K8 e K18	Epiteli semplici; cellule secretorie delle ghiandole sudoripare; cellule di Merkel; tumori benigni del follicolo pilifero; carcinoma squamoso poco differenziato
K9	Cellule soprabasali dei cuscinetti plantari
K15	Epitelio pavimentoso pluristratificato non corneificato (ano, esofago, epiglottide)
K17	Guaina esterna della radice del follicolo pilifero
K20	Cellule di Merkel

Tabella 4
Caratteristiche della profillagrina e della fillagrina

	PROFILLAGRINA	FILLAGRINA
Localizzazione	Granuli cheratoialini dello strato granuloso	Strato corneo
Peso molecolare	600 kD	48 kD
Caratteristiche chimiche	Proteina neutra	Proteina acida
Funzione	Precursore inattivo della fillagrina	Sintesi di macrofilamenti di cheratina

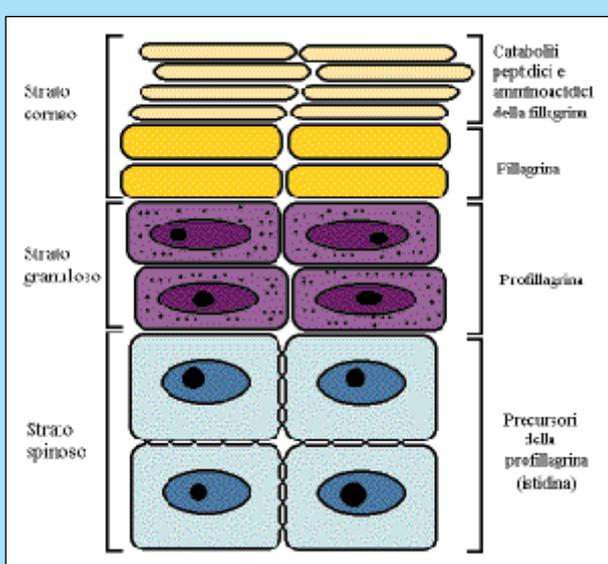


Figura 6 - Metabolismo delle proteine ricche in istidina dell'epidermide.

cellulare, si associ l'attivazione di una lunga catena metabolica di proteine ricche in istidina di cui la profillagrina, presente a livello dello strato granuloso, rappresenta il precursore principale (Tab. 4).^{4,8}

La fillagrina, derivata dal suo precursore per defosforilazione e proteolisi, è anch'essa ricca in istidina e compare nei piani più profondi dello strato corneo.^{4,8,18}

L'attività biologica principale svolta dalla fillagrina è quella di catalizzare la formazione di ponti disolfuro permanenti tra i filamenti di cheratina nelle cellule dello strato corneo, consentendo la formazione di robusti macrofilamenti che sopravvivono alla successiva distruzione cellulare associata con la formazione dello strato corneo, conferendo resistenza e solidità alle cellule desquamanti.⁸

Il proteolizzato della fillagrina si riscontra nei piani medi e superficiali dello strato corneo ed appare costituito da un "pool" di amminoacidi, quali l'acido urocanico e l'acido carbossilico-pirrolidone, che svolgono un'efficace protezione nei confronti delle radiazioni ultraviolette ed un'azione idratante cutanea grazie al loro carattere spiccatamente idrofilo (Fig. 6).³

B.2 FORMAZIONE DELL'ENVELOPE CORNEIFICATO

La costituzione dell'envelope corneificato rappresenta la tappa finale della differenziazione cheratinocitaria verso la costituzione dei corneociti maturi. Queste cellule desquamanti, infatti, sono costituite da una matrice citoplasmatica denso-filamentosa senza più alcuna struttura nucleare e sono circondate da un envelope proteico caratteristico, l'envelope corneificato, che ha uno spessore di circa 15 nm.⁸

Le proteine reclutate per la sintesi dell'envelope corneificato sono rappresentate da: lorocrina, involucrina, cheratolinina (o cistatina A), tricoialina, sciellina, proteina di 195 kD, CREP (Cystin - rich Envelope Protein) e SPRRs (Small Proline-rich Proteins) quali cornifina e pancornulina.¹³

Alla costituzione dell'envelope prenderebbero parte anche fillagrina, cheratina K10 e, grazie all'intervento della transglutaminasi, alcune proteine derivate dalla lisi di organuli cellulari ed indicate come "dust-bin".⁸

L'envelope corneificato, disposto lungo la porzione interna della membrana plasmatica, fornisce al corneocita una notevole resistenza grazie alla formazione di legami covalenti che si realizzano tra i diversi precursori molecolari per l'azione di due diverse transglutaminasi (TGasi) e cioè, la TGasi 1, localizzata in tutti gli strati epidermici e soprattutto in quello granuloso e la TGasi 3, localizzata nello strato granuloso e sintetizzata in forma proenzimatica. Per l'attivazione di questi enzimi (in particolare per la TGasi 3) è indispensabile la presenza di ioni calcio al cui incremento intracellulare, verosimilmente riconducibile ad un aumento della permeabilità membranaria, corrisponde un aumento della formazione di ponti ϵ - (γ -glutamyl) - lisina.^{8,13}

L'esterificazione di proteine con i lipidi della porzione esterna dell'envelope viene a rafforzare la funzione di barriera svolta dagli strati più superficiali dell'epidermide.³

Qualsiasi condizione patologica in grado di modificare il processo di sintesi e di aggregazione della cheratina o la formazione dell'envelope corneificato, può essere responsabile dello sviluppo di malattie scagliese. A questo proposito può essere ricordata una particolare dermatopatia dell'uomo, la psoriasi, in cui si osserva una marcata iperproliferazione epidermica, una produzione di citocheratine atipiche, una ridotta sintesi di profillagrina e fillagrina, con conseguente riduzione di spessore dell'envelope ed una transglutaminasi con ridotta capacità enzimatica.¹⁸

C. DESQUAMAZIONE

Con questo termine si indica il normale processo di esfoliazione dei corneociti dalla superficie cutanea.

In questa fase, i corpi lamellari svolgono un ruolo fondamentale riversando nello spazio interstiziale il loro contenuto costituito da glicolipidi, steroli liberi, fosfolipidi, lipasi, glicosidasi, calcio ed enzimi idrolitici e proteolitici.¹³

Nello spazio intercellulare la composizione lipidica si modifica grazie all'intervento delle lipasi e delle glicosidasi esocitate, la cui azione risulta nella formazione di molecole

maggiormente idrofobiche (sfingolipidi, ceramidi, colesterolo solfato, acidi grassi liberi).¹³

Questo materiale, organizzandosi in doppi strati, si rende responsabile di due importanti eventi biologici:

a) la coesione tra i corneociti più profondi, che consente di mantenere integra la funzione di barriera;

b) la desquamazione "programmata" delle cellule più superficiali dello strato corneo.

Inoltre, la colesteril-solfatasi, la fosfatasi acida, la carbossipeptidasi ed un enzima idrolitico ad azione catepsina-B simile, sembrano essere responsabili della desquamazione e del distacco dei corneociti epidermici dalla superficie cutanea, ultimo atto di una lunga serie di eventi bio-molecolari complessi.^{4,5,7,13,18}

Parole chiave

Cute, cane, cheratinizzazione, corneificazione.

Key words

Dog, keratinization, cornification, skin.

Bibliografia

- Kanitakis J. Structure de la peau. In: Biologie cutanée - 2ème cours spécialisé du Gedac; p. 1. Lyon, 1995.
- Pelagalli G.V., Botte V. Anatomia veterinaria sistematica e comparata. Seconda edizione. Edi Ermes- Milano, volume 3; 1989.
- Reano A. Differentiation épidermique, keratinisation et protéines de structure. In: C.E.S. de Dermatologie, p.1; 1994.
- Suter M.M. Keratinocyte biology. In: Workshop on Skin Biology, p.1. Reichenau, Switzerland 21-24 Agosto, 1991.
- Griffin C. Diseases of keratinization - Part 1. In: Acts of the 1st course in Dermatology of the European School for Advanced Veterinary Studies. Luxembourg, 6-18 Aprile, 1992.
- Kwochka K.W., Rademakers A.M. Cell proliferation kinetics of epidermis, hair follicles and sebaceous glands of Cocker Spaniels with idiopathic seborrhea. *Am J Vet Res*; 50:1918; 1989.
- Haftek M. Couche corneé et desquamation. In: Biologie cutanée, 2ème cours spécialisé du Gedac, p.31. Lyon, 1995.
- Reano A. Differentiation épidermique, keratinisation et protéines de structure. Biologie cutanée - 2ème cours spécialisé du Gedac, p.9. Lyon, 1995.
- Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. Pathology of domestic animals. 4th edition. Academic Press inc., vol.1; 1993.
- Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 5th edition - Saunders Company; Philadelphia, 1995.
- Mechelli L. Aspetti morfo-funzionali cutanei nel cane e nel gatto. Atti del "Corso di base di Dermatologia Veterinaria". Cremona, 1994.
- Martinez - Hernandez A., Amenta P.S. The basement membrane in pathology. *Lab Invest*; 48:656; 1983.
- Suter M.M. et al. Keratinocyte biology and pathology. *Vet Dermatol*; 8:67; 1997.
- Magnol J.P. Histologie generale de la peau. In: C.E.S. de Dermatologie; 1994.
- Staquet M.J. Les molecules de l'adherence cellulaire. Application aux cellules cutanées. Biologie cutanée - 2ème cours spécialisé du Gedac, p.38. Lyon, 1995.
- Kemler R., Ozawa M., Ringwald M. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*; 1:892; 1989.
- Haftek M. Constituants de la jonction dermo-épidermique et des jonctions interkératinocytaires. In: Biologie cutanée, 2ème cours spécialisé du Gedac, p.170. Lyon, 1995.
- Kwochka K.W. Keratinization abnormalities: understanding the mechanisms of scale formation. *Adv Vet Dermatol - Pergamon Press - vol.2*, p.91. Montreal, 1992.
- Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*; 111:2807; 1990.
- Rothe M. Growth factors. *Arch Dermatol*; 125:1390; 1989.
- King L.E. What does epidermal growth factor do and how does it do it? *J Invest Dermatol*; 84:165; 1985.
- Eljgo K., Hennings H., Clausen O.P.F. Altered growth kinetics precede calcium-induced differentiation in mouse epidermal cells. *In Vitro*; 22:332; 1986.
- Elias P.M., Menon G.K., Grayson S., Brown B.S. Membrane structural alterations in murine stratum corneum: relationship to the localization of polar lipids and phospholipases. *J Invest Dermatol*; 91:3; 1988.
- Hennings H., Steinert P., Buxman M.M. Calcium induction of transglutaminase and formation of (γ - glutamyl) ε - lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 102:739; 1981.
- Wilke M.S., Hsu B.M., Wille J.J., Pittelkow M.R., Scott R.E. Biologic mechanisms for the regulation of normal human keratinocyte proliferation and differentiation. *Am J Pat*; 131:171; 1988.
- Suter M.M., Cramer F.M., Slattery J.P., Millard P.J., Gonzalez F.A. Extracellular ATP and some of its analogs induce transient rises in cytosolic free calcium in individual canine keratinocytes. *J Invest Dermatol*; 97:223; 1991.
- Matsumoto K., Hashimoto K., Nishida Y., Hashiro M., Yoshikawa K. Growth inhibitory effects of 1, 25 - dihydroxyvitamin D3 on normal human keratinocytes cultured in serum-free medium. *Biochem Biophys Res Commun*; 166: 916; 1990.
- Fuchs E. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *TIG*; 4: 277; 1988.
- Moll R., Franke W.W., Schiller D.L. The catalog of human cytocheratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*; 31:11; 1982.
- Suter M.M., Greenberger L.J., Wilkinson J.E., Lewis R.M. Differential expression of cell surface antigens of canine keratinocytes defined by monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*; 38: 541; 1990.
- Ivany D., Minke J.M. H.M., Hageman C., Groeneveld E., Van Doornewaard G. Patterns of expression of feline cytokeratins in healthy epithelia and mammary carcinoma cells. *American. J Vet Res*; 53: 304; 1992.
- Suter M.M., Pantano D.M., Augustin-Voss H.G., Varvayanis M., Cramer F.M., Wilkinson J.E. Keratinocyte differentiation in the dog. *Adv Vet Dermatol*; 1: 252; 1990.