

<sup>1</sup> Department of Veterinary Pathobiology Texas A&M University, College Station, Texas, USA

<sup>2</sup> Texas A&M Agricultural Research Extension Center, San Angelo, Texas, USA

<sup>3</sup> Dept. of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

<sup>4</sup> Research and Development, Procter & Gamble Pet Care, Lewisburg, Ohio, USA

## IL RUOLO DELLA NUTRIZIONE NEI CONFRONTI DEL FOLLICOLO PILIFERO CANINO: UNA RELAZIONE PRELIMINARE

Traduzione a cura del Prof. Giacomo Rossi  
Per gentile concessione di



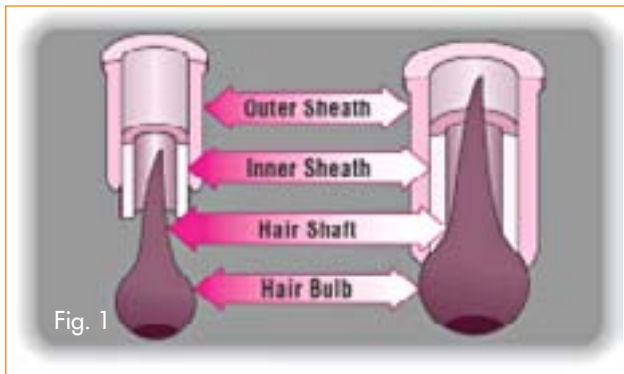
## INTRODUZIONE

Chiedete a qualsiasi proprietario di cane perché dedichi tanto tempo e sforzi alla cura ed alla manutenzione del proprio animale domestico e riceverete varie risposte: *"compagnia, protezione, qualcuno di cui prendersi cura"*, sono risposte probabili. Tuttavia, siamo convinti che le principali ragioni siano essenzialmente due. In poche parole, i cani sono piacevoli da toccare e da guardare. Queste interazioni tattili e visive tra umano e cane sono tra i più grandi piaceri di proprietari di "pet". Di conseguenza, quando il pelo è assottigliato o sembra asciutto e spezzato, c'è un indebolimento di questo rapporto umano-animale. I cani con problemi di pelo sono semplicemente oggetto di minori attenzioni.<sup>(1)</sup> Questo è il motivo per cui la corretta conoscenza del complesso pilo-sebaceo del cane è importante. In questo report, presentiamo una review riguardante il follicolo pilifero e dati preliminari raccolti in uno studio volto a definire gli effetti della nutrizione sul follicolo pilifero del cane e sulle ghiandole annesse.

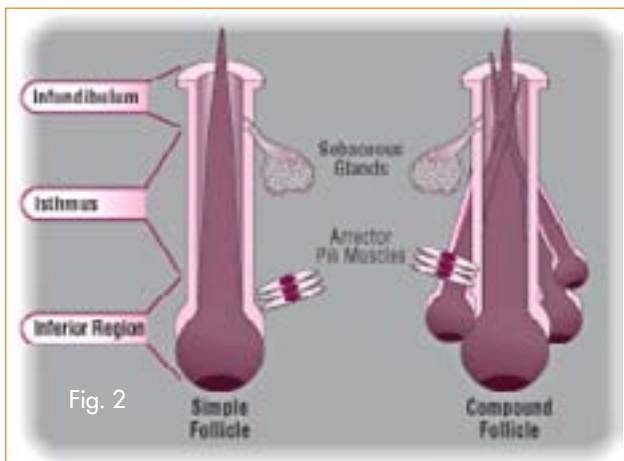
## STRUTTURA E FUNZIONE

Il follicolo pilifero presenta una struttura semplice. Anche se apparentemente il processo di crescita del pelo sembra semplice ed intuitivo, si tratta in effetti di un processo estremamente dinamico che richiede complesse interazioni, alcune delle quali ancora sconosciute, tra epitelio e mesenchima; la fase di crescita poi non è un fenomeno lineare ma vede il susseguirsi di fasi di quiescenza con periodi di crescita. Il modo più semplice per comprendere la morfofisiologia del follicolo pilifero è guardarlo mentre è in crescita attiva (periodo chiamato *"anagen"*). Il follicolo in anagen è costituito da due tubi, uno all'interno dell'altro ed il pelo cresce all'interno di questi due tubi. Il tubo più esterno è conosciuto come guaina esterna e il tubo interno come guaina interna; il rigonfiamento che dirige la crescita del pelo alla base è il bulbo pilifero. All'interno del bulbo pilifero cresce una piccola porzione di tessuto connettivo, la papilla follicolare, che ha un ruolo di regolazione nella crescita, senescenza ed involuzione del pelo (Fig. 1).

Partendo dall'apertura esterna del follicolo pilifero, la regione conosciuta come ostio follicolare o poro, e prendendo in considerazione il bulbo dall'alto verso il basso, il follicolo pilifero può essere diviso in tre segmenti anatomici: l'infundibolo, l'istmo e la regione inferiore. Tradizionalmente, questi segmenti sono stati



suddivisi in base ai siti di inserimento di altre strutture annesse e costituenti il complesso pilo-sebaceo: l'infundibolo si estende dall'ostio follicolare all'inserimento del dotto della ghiandola sebacea, l'istmo va dall'inserzione del dotto della ghiandola sebacea fino all'inserzione del muscolo erettore del pelo e il segmento inferiore si estende dall'inserzione del muscolo erettore del pelo fino alla base del follicolo (Fig. 2).

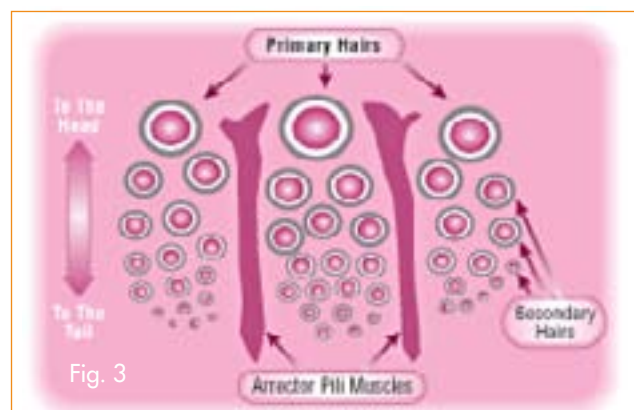


Ci sono diverse importanti differenze nella struttura del follicolo pilifero nelle diverse specie. La maggior parte degli erbivori e degli onnivori hanno follicoli "semplici".

Ciò significa che ogni infundibulo contiene un singolo pelo che fuoriesce da una singola apertura. Fanno eccezione erbivori produttori di "fibre tessili" come capre, pecore o lama, che hanno 2 o 3 peli per ciascun infundibulo. I carnivori, al contrario, hanno follicoli "composti", cioè più follicoli piliferi crescono insieme e si uniscono nella regione istmica alta, condividendo un unico infundibulo fuoriuscendo da un ostio comune (Fig. 2). Per convenzione, il più grande pelo del gruppo appartenente ad uno stesso follicolo è chiamato pelo primario, mentre i più piccoli, che costituiscono la massa maggiore, sono chiamati peli secondari o sottopelo. Va inoltre osservato che alcune specie (ovini, ratti, topi), mantengono la vecchia peluria durante la crescita dei nuovi peli. Questo non implica

che abbiano follicoli composti, anche se si possono ritrovare 2 peli nello stesso infundibulo.

Vi è una simmetria sorprendente nell'orientamento dei follicoli piliferi dei carnivori. Invece di essere dispersi casualmente sulle pelle, un pelo primario si ritrova con i relativi peli secondari generalmente in gruppi di tre. Chiameremo questo gruppo di follicoli "unità follicolare". Quindi, se si guarda molto attentamente con una lente d'ingrandimento la superficie della pelle di un cane, l'unità follicolare apparirà caratterizzata da 3 aperture ravvicinate, poi uno spazio e successivamente altre 3 aperture ravvicinate. Inoltre, vi è anche un distinto orientamento dei peli primari e secondari. I peli primari sono solitamente in posizione più craniale; sono disposti con il pelo primario al centro lievemente preceduto e fiancheggiato da altri 2 peli primari. I peli secondari sono più caudali rispetto ai peli primari. I peli secondari più vicini al pelo primario sono i più grandi e diventano progressivamente più piccoli spostandosi caudalmente. Il muscolo erettore del pelo separa le tre componenti del follicolo. In questo modo, i follicoli piliferi sono strutturati in modo che i peli secondari si trovino uniformemente sotto al pelo primario, al di sopra del sottile sottopelo. È un dato oramai comunemente acquisito che il pelo dei cani consti di due tipi di peli differenti, primari e secondari. Ciò in realtà non è esatto, in quanto vi è un continuum nei diametri del pelo e l'unico modo per distinguere un pelo primario da uno secondario è quello di stabilire il diametro dei peli in un'area di taglio, definendo poi anatomicamente il pelo primario; il pelo più anteriore in ogni gruppo di follicoli può essere considerato pelo primario, dato il suo diametro (Fig. 3). Il rapporto tra peli secondari e primari può essere >10:1.



Dal punto di vista ontogenetico, nella maggior parte dei mammiferi i follicoli iniziano a svilupparsi in periodo prenatale ed in area cefalica, diffondendo come un'onda su tutto il resto del corpo. In molte specie con un denso manto come i cani, cresce prima il follicolo

primario mentre il secondario, più piccolo, cresce dal follicolo primario.<sup>(2)</sup>

Nella costituzione del pelo rientra una moltitudine di proteine, delle quali ne sono state caratterizzate molto bene circa 50-100. I due principali gruppi di proteine che costituiscono la massa del pelo sono (1) filamenti intermedi di natura cheratinica pelo-specifici, chiamati anche cheratine "a basso contenuto di zolfo" o "cheratine forti", per distinguerle dalle cheratine dell'epidermide (2), e le proteine di matrice che organizzano le cheratine, chiamate proteine cheratina-associate o proteine associate ai filamenti intermedi. Come nell'epidermide, anche nel follicolo pilifero si osservano essenzialmente due diverse tipologie di cheratina strutturalmente correlate ovvero filamenti di cheratina a reazione acida (cheratina tipo 1) e una neutra o leggermente alcalina (cheratina tipo 2). Entrambe risultano polimerizzate a formare filamenti di diametro di 8-10 nm. La stabilità dei filamenti di cheratina dipende dal numero di legami, inclusi i legami covalenti, del tipo *cross-linked* o crociato con la cistina.<sup>(3)</sup>

Le proteine cheratina-associate sono raggruppate in 3 grandi famiglie, il gruppo di proteine "ad alta concentrazione di zolfo o a "zolfo alto", il gruppo ad altissima concentrazione di zolfo o "ultra-high zolfo" e il gruppo "alta glicina/tirosina". Ciascuno di questi gruppi contiene poi a sua volta molte sottofamiglie.

## IL CICLO DEL PELO

La crescita del pelo è ciclica e la maggior parte delle modificazioni morfologiche associate al ciclo si verificano nella metà inferiore del follicolo pilifero. La fase di crescita attiva è chiamata *anagen* ed è caratterizzata istologicamente da un bulbo che circonda una papilla follicolare e dalla porzione interna completamente formata. La fase di involuzione, compresa tra la fase attiva e quella di non crescita è chiamata "*catagen*". Durante il *catagen* c'è perdita del bulbo pilifero e separazione dalla papilla follicolare.

Anche se si osserva un aspetto coartato a livello della guaina follicolare e si registra un aumento del numero di cellule apoptotiche nella guaina esterna, la caratteristica principale del follicolo in fase di *catagen* è la parziale sostituzione della guaina interna attraverso una con corneificazione trichilemmale, la perdita del bulbo e l'evaginazione della papilla follicolare. La fase di "*telogen*" corrisponde alla senescenza del pelo ed è caratterizzata dalla completa sostituzione della guaina interna sempre tramite un processo di corneificazione trichilemmale. Un follicolo in *telogen* è lungo

approssimativamente un terzo di un follicolo in fase di *anagen*. La porzione di guaina esterna alla base di un follicolo in *telogen* è composta da un piccolo nido di cellule basali, molto compatto, noto come "germe del pelo". Questo aggregato di cellule, poggia sulla papilla follicolare che è poco definita quando non invaginata nel bulbo pilifero. Il *telogen* è una fase fisiologica, non patologica e fa parte del ciclo del pelo come l'*anagen*. Il *telogen* diventa patologico quando una nuova fase *anagen* non rimpiazza un pelo in *telogen* e il pelo continua a degenerare.

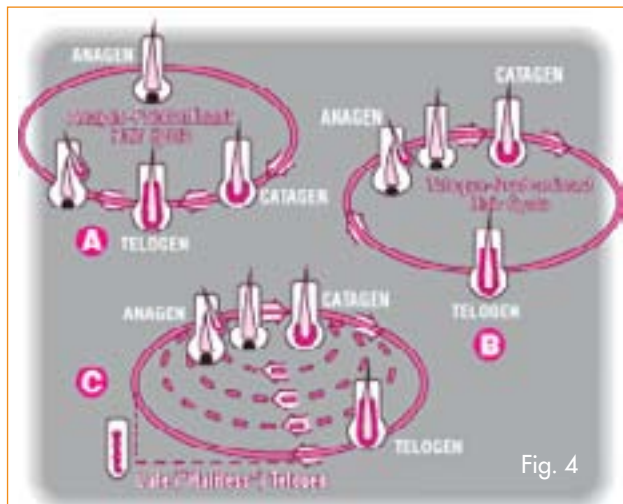


Fig. 4

Il tempo richiesto dal pelo per completare un ciclo varia da specie a specie e differisce tra le varie razze di cani. Nel cuoio capelluto della specie umana, l'*anagen* è la fase più lunga del ciclo; perciò il pelo cresce quasi costantemente, con la conseguente necessità del taglio dei capelli. Nella maggior parte dei mammiferi il ciclo del pelo è basato sul *telogen*: i peli crescono fino ad una lunghezza predeterminata per poi entrare in una fase di inattività nella quale il follicolo pilifero entra in *telogen*. Un ottimo esempio di ciclo *telogen* avviene nei mammiferi con gli aculei. Nel 1996, abbiamo descritto le caratteristiche degli aculei nell'istrice, nel riccio e nell'echidna. Abbiamo rilevato che dopo che gli aculei sono cresciuti fino ad una lunghezza determinata, il follicolo entra in una fase di *telogen*, stato in cui l'aculeo è ben saldo grazie alla guaina esterna. Questi aculei non cadevano, né crescevano. Nei ricci, gli aculei possono permanere per anni o addirittura per l'intera vita dell'animale. La valutazione della crescita e del mantenimento dei peli equivale al calcolo della conservazione delle proteine e dell'energia richiesta per la loro sintesi. Riteniamo che il ciclo del pelo in molte specie canine è più simile a quello dei mammiferi provvisti di aculei piuttosto che all'uomo. In breve i cani hanno un ciclo del pelo nel quale predomina la fase telogenica nella quale il

manto è mantenuto in follicoli telogen per lunghi periodi di tempo. Per quanto tempo il follicolo rimanga in telogen è un fenomeno razza-specifico. In molte razze canine come le razze nordiche, il pelo appare permanente in fase telogen, a volte per anni. In altre razze, come i Barboncini, il ciclo è basato sulla fase anagen, e questi cani necessitano, come gli umani di tagli frequenti del pelo.

## FATTORI CHE CONTROLLANO IL CICLO DEI PELI

Tutti i follicoli piliferi hanno un ritmo intrinseco che può essere alterato da fattori sistemici. L'interazione tra fattori locali (intrinseci) e sistemici (estrinseci) nel controllo del ciclo dei peli è stato illustrato da studi su innesti di cute fatti nei ratti. Porzioni asportate da fianchi di ratti e ruotate di 90-180 gradi e poi riposizionate, continuano a crescere allo stesso ritmo del sito originale per lungo periodo. Allo stesso modo, trapianti tra ratti singenici di differente età mantengono il modello di crescita del donatore. Alla fine, tuttavia, il ciclo dei peli della parte trapiantata si sincronizza con la pelle circostante.<sup>(6)</sup>

Nel follicolo pilifero sono prodotti fattori intrinseci, conosciuti come fattori di crescita o citochine che agiscono su vari tipi di cellule incluse le cellule della matrice del pelo, guaina interna ed esterna, nonché cellule mesenchimali della papilla follicolare ma anche fibroblasti che circondano il follicolo e cellule endoteliali dei vasi sanguigni che irrorano i follicoli (Tab. 1).<sup>(7,25)</sup>

Tab. 1

Intrinsic Factor	Site(s) of Production	Site(s) of Release	Effect on Hair Follicle
Epidermal growth factor	Cuticle sheath	Cuticle sheath Hair bulb	In vitro: Stimulates hair growth In vivo: Prolongs hair growth
Transforming growth factor A	Cuticle sheath	Cuticle sheath Hair bulb	In vitro: Stimulates hair growth In vivo: Prolongs hair growth
Fibroblast growth factors (FGF) FGF-1,2	Cuticle sheath Inner root sheath Hair bulb basement membrane	Cuticle sheath Inner root sheath Hair bulb basement membrane	In vitro: Stimulates hair growth In vivo: Inhibits hair growth
Transforming growth factor-β	Entire follicle	Entire follicle?	Inhibits hair growth
Insulin-like growth factor	Follicular papilla	?	Stimulates hair growth
Interleukin 1	Follicular papilla	Entire follicle	Inhibits hair growth
Vascular endothelial growth factor	Follicular papilla Hair bulb	?	Stimulates hair growth
Regulatory growth factor/cytokine factor	Follicular papilla	Matrix cells	Stimulates hair growth

I fattori estrinseci sono invece quelli che, prodotti da un altro organo, vengono trasportati al follicolo attraverso il sangue periferico. Gli ormoni sono i fattori estrinseci meglio definiti. Quelli che influiscono sulla crescita del pelo sono la melatonina, che agisce in sinergia con la prolattina, gli ormoni sessuali prodotti dalle gonadi e dalle surrenali che possono inibire o stimolare i

follicoli. L'attività inibente o stimolante dipende quindi dal tipo di ormone e dall'area cutanea interessata: a seconda dell'ormone e della localizzazione anatomica dell'area cutanea potremmo avere effetti differenziati. Ormoni che operano stimolando attività follicolari contrapposte sono ad esempio i glicocorticoidi che inibiscono la crescita pilifera, mentre gli ormoni tiroidei la stimolano.<sup>(26,37)</sup>

Entrambi i fattori, intrinseci ed estrinseci, cooperano nel controllo della lunghezza del ciclo pilifero e, di conseguenza, la lunghezza dei peli risulta geneticamente determinata. Le basi molecolari per le modificazioni morfologiche che si verificano nel ciclo del follicolo pilifero sono in gran parte sconosciute e non ci sono molecole regolatrici, identificate come specifiche per il follicolo pilifero.

## EFFETTI DELLA NUTRIZIONE SUL FOLLICOLO PILIFERO

A causa della natura dinamica della crescita dei peli e dal momento che i peli sono composti primariamente da proteine tenute insieme da lipidi, il mantenimento di un manto in condizioni ottimali depaupera l'organismo di una buona percentuale di energia e materie prime introdotte con la dieta. Buffington ha recentemente dimostrato che il 30% della richiesta proteica giornaliera di cani e gatti può essere utilizzata per la sintesi di cheratina di pelle e peli.<sup>(36)</sup> In studi su ratti e maiali, periodi di deprivazione cronica di proteine producono una riduzione nella sintesi di proteine primariamente a livello cutaneo e a tasso molto più elevato nella pelle rispetto che in altri organi.<sup>(37,38)</sup>

Sfortunatamente gli autori di questi studi non indicano il distretto cutaneo ove avviene la maggior diminuzione nella sintesi di proteine. Considerando che l'epidermide è essenziale per la vita, è improbabile che l'organismo, anche in caso di bisogno, operi tagli energetici o privi di certe fonti proteiche questo distretto organico. Inoltre, il derma è un tessuto relativamente stabile, con un basso *turn-over* proteico. Così, è difficile capire che una diminuzione di proteine del derma e glicosamminoglicani risulti in una conservazione di proteine. L'unico sito in cui le proteine della pelle vengono conservate con poco o nessun danno per il cane, è il follicolo pilifero. Per questo motivo, carenze alimentari in amminoacidi, carboidrati, acidi grassi essenziali, o una qualsiasi vitamina, metalli o minerali necessarie per la sintesi di proteine o lipidi può interessare il follicolo pilifero.

Queste modificazioni sono meglio definite in casi ca-

renziali profondi. Carenze dietetiche sono quasi sempre associate a perdita di pelo o qualità scadente dello stesso come anche in condizioni di deficit di rame, zinco, vitamina A, vitamina C (in specie che non possono sintetizzarla), vitamina D, vitamina E, riboflavina, acido nicotinico, biotina, acido pantotenico, cianocobalamina e rame.<sup>(39-42)</sup>

Tuttavia, vi è la prova che anche lievi variazioni nella dieta possono causare variazioni nel diametro pilifero. Ad esempio, in capre angora, c'è una correlazione positiva tra peso corporeo e diametro del pelo.<sup>(43)</sup>

Molto di quello che sappiamo sugli effetti della nutrizione sul follicolo pilifero si basa su studi condotti in esseri umani, roditori, o animali utilizzati per la produzione di fibre (pecore e capre).<sup>(39-44)</sup>

Non si sa se le conoscenze su queste specie possano essere applicate ai cani; tuttavia, vi sono prove che suggeriscono che un confronto interspecie potrebbe non essere valido. In primo luogo, la base anatomica dei peli canini differisce da quella del pelo dell'uomo, topo, pecora e capra. Topo e uomo hanno follicoli semplici e pecore e capre hanno alcuni follicoli semplici e altri complessi. Nessuna di queste specie presenta la condizione in cui dallo stesso ostio follicolare fuoriesce un certo numero di peli, come avviene nel cane. Inoltre, solo i cani presentano una caratteristica simmetria nella disposizione dei peli primari e secondari nel follicolo, che non si ritrova in altre specie. In base a tale simmetria i peli possono essere distinti anatomicamente in peli primari (i primi 3 follicoli anteriori in ciascun gruppo di follicoli che formano un'unità follicolare) e secondari. In più, fatta eccezione per quelle razze come il Barboncino che richiedono dei tagli frequenti del pelo, per la maggior parte delle razze canine la fase telogenica è una fase lunga, se non la più lunga del ciclo del pelo. Questo non è vero negli esseri umani, topi e animali allevati per la produzione di fibre tessili. Pensiamo che la ragione per cui molte razze canine hanno sviluppato una lunga fase telogenica sia perché con questa tipologia di crescita del pelo l'animale ha la possibilità di un notevole recupero-conservazione del pool proteico-amminoacidico e quindi di energia. In base a questa stessa logica, le razze nordiche hanno una fase telogenica ancora più lunga rispetto ad altre razze, data la necessità di un folto manto per sopravvivere e l'elevato fabbisogno energetico-proteico durante i mesi invernali, periodo in cui le proteine sono più difficili da ottenere. Allo stesso modo la razza Barboncino che presenta crescita continua del pelo, potrebbe avere richieste alimentari diverse rispetto a razze che possono mantenere i

peli in uno stato metabolico di "animazione sospesa" per periodi molto lunghi.

Siamo attualmente coinvolti in uno studio per definire gli effetti della nutrizione sulla pelle. L'obiettivo principale di questo studio è definire se cambiamenti di alimentazione possano influenzare la crescita e la qualità del manto.

## TECNICHE DI STUDIO DEI FOLLICOLI PILIFERI

Negli ultimi 15 anni ci sono stati grandi progressi tecnologici nell'analisi morfologica di peli umani e di animali produttori di fibre, ma nessuno di questi metodi è stato sino ad oggi applicato allo studio del pelo degli animali da compagnia.

### **Analisi del pelo con DermoScopio**

Il DermoScopio è un microscopio esterno e portatile, che produce un'elevata qualità di immagini digitali. Ad oggi, questo strumento è stato utilizzato dai dermatologi per valutare i cambiamenti sulla superficie della pelle umana. Abbiamo adattato il suo uso a microscopio a scansione per esaminare peli del manto a ingrandimenti fino a 600x.

### **Analisi di sezioni orizzontali di campioni di biopsie cutanee**

Nel 1984, Headington descrisse un semplice metodo innovativo che ha rivoluzionato il modo con cui i dermatologi guardano al follicolo pilifero.<sup>(45)</sup> Piuttosto che esaminare un punch cutaneo eseguito verticalmente (dall'epidermide al sottocute), pensò che il modo migliore per esaminare il follicolo pilifero e le sue patologie fosse tramite una biopsia trasversale (attraverso il derma, su un piano parallelo all'epidermide). Le sezioni istologiche risultanti contenevano più informazioni perché contenevano più follicoli piliferi in un unico punch. L'Autore dimostrò quindi per la prima volta che non è sempre necessario eseguire numerose biopsie per determinare la gravità di un'alopecia o per determinare il numero di follicoli piliferi che crescono attivamente o si trovano in uno stato atrofico. Inoltre, sezionati trasversalmente, i peli risultano più facili da misurare, permettendo in tal modo un'analisi morfologica. La tecnica di Headington portò alla pubblicazione di centinaia di articoli sull'analisi quantitativa nella perdita dei capelli e rimane una tecnica ampiamente utilizzata nelle diagnosi dermatologiche in umana.<sup>(46,47)</sup>

Dal momento che questa tecnica risulta tanto utile in

umana per esaminare i follicoli piliferi, è risultata ancora più utile nel cane per la valutazione di follicoli compostianina. I cani possono avere più di 30 peli per infundibolo. Cercare di vedere tutti questi peli in sezioni verticali è quasi impossibile senza decine di sezioni. Inoltre, solo tramite sezioni trasversali si può definire morfologicamente il pattern di crescita pilifera. Questo metodo permette inoltre di determinare con precisione il rapporto anagen/telogen.

### **Analizzatore di densità delle fibre a fibra ottica (OFDA)**

L'OFDA è essenzialmente un microscopio computerizzato che viene posizionato su un campione pulito di pelo in movimento della lunghezza di 2 mm. Il microscopio ingrandisce e cattura le immagini video delle singole porzioni di pelo. La larghezza di ciascuna fibra identificata viene poi misurata. Oltre al diametro della fibra, viene misurato il grado di curvatura della fibra. Dopo la misurazione, i dati sono convertiti ed elaborati sottoforma di un istogramma rappresentativo del diametro della fibra e del grado di curvatura della stessa. La deviazione standard e il coefficiente di variazione vengono calcolati per entrambi i parametri, diametro e curvatura. I vantaggi nell'usare l'OFDA consistono nella sua precisione (lo strumento ha una risoluzione di 1 micron e può determinare con precisione diametri tra 4 e 300 microns) e nella sua velocità (possono essere valutate un numero maggiore di 10.000 fibre al minuto). Inoltre, riteniamo che ogni razza canina abbia un proprio caratteristico istogramma-OFDA e che l'applicazione sistematica della metodica possa portare alla classificazione di ogni razza inserendola in un piccolo gruppo di razze con caratteristiche morfofisiologiche di pelo simili.

## **MATERIALI E METODI**

Tutte le procedure per l'allestimento del protocollo sperimentale sono state realizzate in ottemperanza delle norme dell'"Animal Use Committee, Texas A&M University".

### **Animali usati nello studio e diete**

Questo studio è stato eseguito sulla stessa popolazione di animali utilizzati per studiare gli effetti della dieta sul sebo (per chi volesse visualizzare l'intero schema sperimentale inerente i dettagli circa gli animali utilizzati e le diete, si faccia riferimento al capitolo di Dunstan et al., intitolato "Il ruolo della nutrizione sulla secrezione di sebo nel cane: una relazione prelimi-

nare").

### **Raccolta dei campioni**

I campioni sono stati raccolti il giorno precedente l'inizio dell'alimentazione con diete sperimentali, poi ad intervalli di 3 e 18 settimane. Per evitare qualsiasi problema con i ritmi giornalieri, tutti i campioni sono stati raccolti tra le 9.30 AM e le 11.30 AM. Campioni di peli sono stati ottenuti dalla porzione dorso laterale del tronco in un'area estesa dall'area lombare fino alla regione caudale cervicale. Date le limitazioni nella taglia dei cuccioli, sono state utilizzate diverse aree per diverse raccolte. Per la valutazione *DermScope*, è stata usata la regione dorso lombare. Per la valutazione del tasso di crescita dei peli e l'analisi OFDA, è stata usata l'area toracica e quella dorsale anteriore/cervicale caudale. Sono state prelevate biopsie cutanee dall'area toracica dorso laterale.

### **Valutazione DermScope**

Per preparare la zona per la valutazione con *DermScope*, l'area è stata delicatamente inumidita con un batuffolo di cotone imbevuto di alcool. Sono state effettuate immagini multiple usando lenti a 200x, messe poi in relazione a sezioni istologiche verticali e trasversali.

### **Determinazione del tasso di crescita del pelo**

Il tasso di crescita dei peli è stato determinato al termine dello studio di 18 settimane. Per il campionamento è stato utilizzato uno spazio sopra l'area destro-laterale caudo cervicale/toracica anteriore. Nell'intera area il pelo è stato tagliato con una lama da bisturi #50. Un pelo è stato preso come campione controllo e definito di lunghezza "normale". I peli ricresciuti sono stati campionati al giorno 3, 7, 14, 21, 28 e 42; ciascun campione è stato prelevato dalle aree menzionate precedentemente. I campioni tagliati sono stati fissati su vetrino usando nastro biadesivo e un copri oggetto. 50 di questi peli sono stati digitalizzati con una fotocamera Sony® calibrata per assicurare lo stesso ingrandimento per ogni misurazione. È stata quindi determinata la lunghezza dei peli in queste immagini e i dati poi convertiti in millimetri usando un'immagine NIH.

### **Analisi OFDA**

Per l'analisi OFDA, è stata tricotomizzata una zona di circa 4 millimetri. I campioni ottenuti sono stati sgrassati e rifilati in campioni di 2 mm di lunghezza. I frammenti sono stati posizionati in uno schiacciatore automatico e distribuiti "random" in sezioni seriali.

Preparate le sezioni, sono state posizionate sotto al microscopio per la misurazione del diametro e della curvatura.<sup>(48)</sup>

### Valutazione morfologica e istologica dei campioni di biopsie cutanee

Due biopsie di 6 mm sono state usate per la valutazione morfologica e morfometrica dei follicoli piliferi. Le biopsie sono state ottenute sotto anestesia locale con tecnica chirurgica e i campioni sono stati fissati in formalina al 10%. Dopo la fissazione, una biopsia è stata tagliata verticalmente, l'altra è stata sezionata orizzontalmente. I campioni sono stati processati come di routine, tagliati e sezionati a 5µm e colorati in ematossilina e eosina. Sui campioni sezionati verticalmente è stata fatta una valutazione morfologica routinaria. I campioni sezionati orizzontalmente, sono stati tagliati sequenzialmente finché non sono state identificate 5 unità follicolari sulla stessa sezione. I campioni sezionati orizzontalmente sono stati valutati come di routine e morfometricamente. L'analisi morfometrica comprende la valutazione di: (1) lo stadio del ciclo del pelo, definito per ciascun follicolo nelle 5 unità follicolari valutate e (2) la conta del numero di peli/unità follicolari. Un follicolo pilifero è stato considerato in *anagen* quando un sottile strato di cellule basali circondava l'asse del pelo a livello dell'istmo del follicolo. Un follicolo pilifero è stato considerato in *telogen* fisiologico quando la corneificazione trichilemmale circondava il pelo a livello della regione istmica. Infine un follicolo è stato considerato "a termine" o in fase di *telogen* patologico quando era vuoto ovvero mancante della porzione di fusto pilare a livello dell'istmo e aveva al tempo stesso una corneificazione trichilemmale luminale ma in assenza dell'asse del pelo, oppure ancora quando si osservava un semplice asse epiteliale ma in assenza di corneificazione trichilemmale endoluminale. Dato che peli catagenici sono impossibili da riconoscere in sezioni trasversali e non sono così comuni (<2% di tutti i follicoli) non sono stati valutati in questo studio. I peli anagenici e telogenici sono poi stati categorizzati anatomicamente in peli primari o secondari.

## RISULTATI

### Valutazione DermScope

L'esame in *DermScope* ha evidenziato differenze nel numero e nelle modalità di eruzione del pelo attraverso l'ostio follicolare. Come regola generale, i follicoli composti sono organizzati in gruppi da 3, anche se

sono stati riscontrati alcuni follicoli unici o in gruppi di 5 unità. La valutazione *DermScope* è stata abbastanza dettagliata per permettere la valutazione del modello cuticolare del pelo in crescita. In tutti i cani, non sono state notate differenze strutturali e non ci sono differenze attribuibili alla dieta.

L'esame in *DermScope* è stato anche utilizzato per valutare l'epidermide. In tutti i cani, l'epidermide era depigmentata e opaca, cosa che ha consentito la visualizzazione del derma e in una certa misura, della base dei peli pigmentati. Occasionalmente, è stato identificato l'organo neurocettivo associato al follicolo pilifero. Con l'esame tramite *DermScope* non sono state identificate differenze nell'epidermide, riferibili alle diete.

### Valutazione morfologica e morfometrica su campioni di biopsie cutanee

Tab. 2

	Low-quality Diet			High-quality Diet		
	Week 0	Week 9	Week 18	Week 0	Week 9	Week 18
<b>Morkies</b>						
Hair follicles/follicular unit	35.0	38.5	43.2	28.4	35.3	32.0
Hair follicles with hair shafts/follicular unit	24.9	29.1	25.2	22.2	19.0	15.5
Hair follicles in anagen/follicular unit	24.8	17.8	25.4	20.6	35.0	25.6
Hair follicles in telogen/follicular unit	13.6	22.0	17.7	7.9	20.4	20.4
<b>Poodles</b>						
Hair follicles/follicular unit	18.0	19.7	23.6	14.7	20.3	21.8
Hair follicles with hair shafts/follicular unit	11.0	15.4	21.3	10.3	15.0	18.8
Hair follicles in anagen/follicular unit	11.0	15.4	21.0	10.3	15.0	18.8
Hair follicles in telogen/follicular unit	5.1	4.3	2.5	5.5	5.3	3.2
<b>Labrador Retrievers</b>						
Hair follicles/follicular unit	25.8	21.7	31.5	17.5	32.2	24.4
Hair follicles with hair shafts/follicular unit	13.7	15.5	19.5	11.7	20.2	19.8
Hair follicles in anagen/follicular unit	10.4	5.1	9.7	7.2	8.8	11.2
Hair follicles in telogen/follicular unit	15.5	16.6	21.8	10.3	23.3	13.1

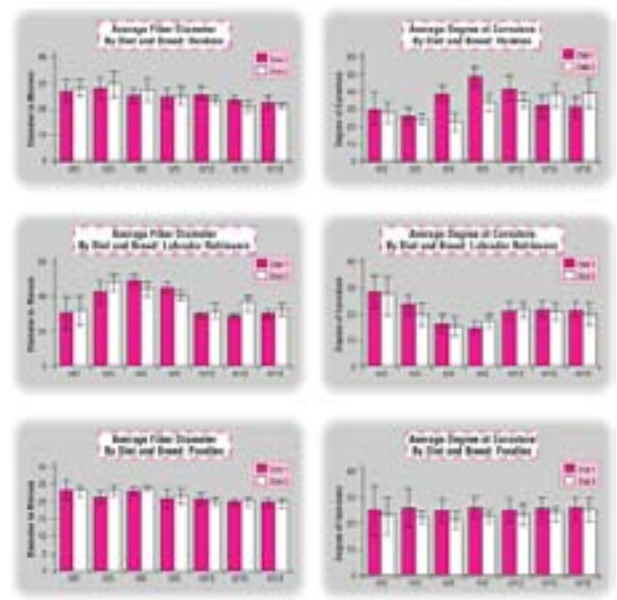
I campioni sezionati verticalmente evidenziano un derma che si ispessisce col tempo dall'inizio dello studio al termine. Le ghiandole sebacee sono diventate più grandi. L'intera morfologia follicolare è risultata difficile da identificare con questo tipo di taglio. Come notato con l'esame tramite *DermScope*, la maggior parte delle unità follicolari era raggruppata in gruppi di 3, ma occasionalmente le unità follicolari consistevano di un unico follicolo composto e a volte alcune unità follicolari avevano 4 o più follicoli composti. Come regola generale, più alto è il numero di follicoli composti in un'unità follicolare, più grande sarà il follicolo primario centrale e il manto che produce. Nessuna differenza può essere attribuita alla dieta. I risultati della

analisi effettuate sulle biopsie cutanee sezionate orizzontalmente sono riportati in Tabella 2.

Siberian husky alimentati con dieta di alta qualità hanno avuto un aumento nel numero di follicoli piliferi per unità follicolare rispetto a quelli alimentati con una dieta di bassa qualità; queste differenze si sono osservate alla 9° e alla 18° settimana. Al contrario, Labrador Retrievers e Barboncini toys alimentati con la dieta di alta qualità hanno evidenziato un minor numero di follicoli/unità follicolare in 18° settimana, ma non alla 9° settimana. Come valore percentuale rispetto alla settimana 0, Labrador Retrievers alimentati con una dieta ad alta qualità avevano più follicoli per unità follicolare alle settimane 9 e 18, mentre i Barboncini toys non sembravano essere influenzati dalla dieta sul numero di follicoli presenti in 9° e 18° settimana rispetto alla settimana 0. In entrambe le razze non è stata notata una differenza nel numero dei follicoli/unità follicolare. In tutte le razze, le differenze sostanziali legate alla dieta sono state difficili da dimostrare. Tuttavia, questi dati sono lievemente alterati a causa di un moderato aumento del numero di follicoli in telogen nell'Siberian husky e nel Barboncino toy alimentati con diete di alta qualità, mentre si osservava una marcata diminuzione del numero di follicoli in telogen nei Labrador Retrievers alimentati con questa dieta.

### Analisi OFDA

Tab. 3



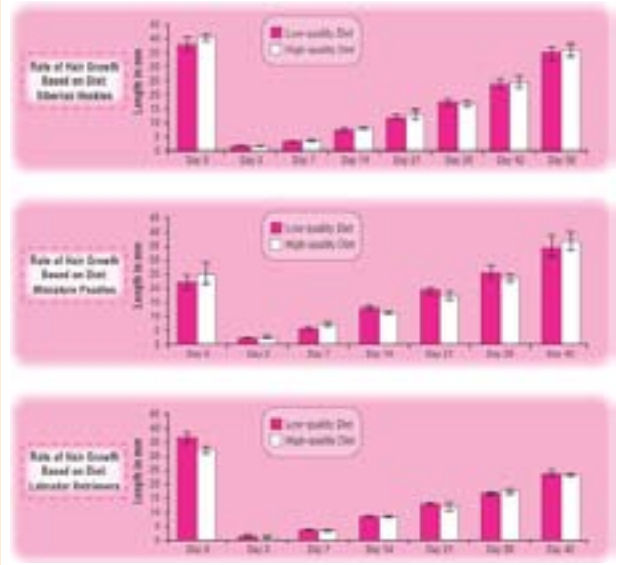
I dati ottenuti con l'analisi OFDA sono stati interpretati analizzando il diametro e la curvatura di tutti i peli misurati, riportati sottoforma di istogrammi, analizzando poi il significato di diametro e curvatura. Nel complesso, le due diete non hanno dimostrato effetti

sul diametro o sulla curvatura nel tempo di studio sia per i Labrador Retrievers che per i Barboncini toys; comunque i Siberian Huskies alimentati con la dieta di alta qualità mostrano curve un po' più ampie rispetto a quelli alimentati con una dieta di bassa qualità (Tab. 3).

### Tasso di crescita dei peli

Come mostrato in Tabella 4, non ci sono sostanziali differenze nella crescita dei peli basate sulla dieta.

Tab. 4



### DISCUSSIONE

Gli effetti della dieta sullo stato fisiologico e di crescita del pelo canino sono molto sottili, se comparati agli effetti indotti dalla razza e dal tempo. L'analisi Dermoscopica e quella tramite OFDA non mettono in evidenza differenze sostanziali con l'eccezione di una maggiore curvatura per i Siberian Huskies alimentati con dieta di alta qualità. Nella valutazione delle sezioni orizzontali si osserva un maggiore e più forte incremento nel numero dei follicoli per unità follicolare nei Labrador Retrievers e nei Siberian Huskies alimentati con diete ad alta qualità. Al contrario la qualità della dieta non influenza il Barboncino toy. Attualmente non ci sono delle convincenti spiegazioni per giustificare questa disparità di risultati ottenuti nelle differenti razze studiate.

Anche l'analisi OFDA non ha individuato differenze nel diametro medio del fusto del pelo in base alla dieta. I Siberian Huskies alimentati con cibo di alta qualità hanno presentato un leggero incremento nella curvatura del pelo rispetto alle altre razze alimentate con dieta di minore qualità.



La percentuale di follicoli/unità follicolari in fase telogenica è diminuita nei Labrador retrievers alimentati con dieta di alta qualità ma è lievemente diminuita nei Siberian Huskies e nei Barboncini toys alimentati allo stesso modo.

Non ci sono comunque evidenze statisticamente significative che la somministrazione di queste diete differenziate abbia indotto una differenza nella crescita dei follicoli piliferi.

Come si spiega quindi questa mancanza di differenze legata alla dieta? Una spiegazione potrebbe essere che la peggiore qualità della dieta non ha comunque creato deficit nutrizionali tali da indurre alterazioni follicolari, oppure che la maggiore qualità della dieta migliore non ha comunque raggiunto valori tali da influenzare la crescita follicolare. Un'altra possibile spiegazione è che comunque un periodo di 18 settimane, quale quello utilizzato nel nostro studio, sia sufficiente per apprezzare delle differenze nella velocità e tipologia di crescita del follicolo.

Un aspetto del follicolo pilifero di molte specie di mammiferi è la sua capacità di ritenere al suo interno il fusto del pelo in uno stato di non crescita, in quella fase che è definita *Telogen*. Analogamente ad una ibernazione follicolare, questa fase telogenica può mantenere un pelo in vita per molto tempo pur con un minimale dispendio di energia e di proteine.

Riteniamo che molte specie di cani abbiano un ciclo del pelo che è basato su una lunga fase telogenica. Dai dati del nostro studio emerge che i Siberian Huskies ed i Labrador Retrievers rientrano in questa categoria. Alla fine della diciottesima settimana del trial, i Labrador Retrievers ed i Siberian Huskies che avevano mangiato un cibo di alta qualità hanno presentato rispettivamente il 56 ed il 50% dei loro follicoli in fase telogenica. Perché i follicoli piliferi di queste razze rispondano al cambiamento dietetico ancora non è noto. Abbiamo dimostrato che i cani Beagle con ipotiroidismo indotto dalla somministrazione di Iodio 131 non divengono alopecici ma non presentano neppure ricrescita del pelo, quando questo viene tagliato, dal momento che la maggior parte dei loro follicoli sono in prolungato stato telogenico. In base a questo studio, ipotizziamo che solo cani giovani ed in perfetta salute cambino il pelo poiché sono in stato nutrizionale e metabolico ideale e ciò permette loro di effettuare il cambio e di avere una successiva e completa ricrescita. Se la nostra teoria è corretta, i cani che trascorrono un lungo periodo alimentati con cibo scadente e con quantità non appropriate avranno un progressivo ed inevitabile aumento dei peli in fase telogenica, e tali

peli saranno mantenuti e non cambiati sino a che il cane non tornerà ad un periodo alimentare corretto e ricco. Attualmente è quindi in corso uno studio su un grosso numero di cani, che potrà confermare oppure sconfessare questa teoria.

Ma come mai il pelo dei Barboncini toys non sembra seguire questa regola che ipotizziamo? Potrebbe dipendere dal fatto che il pelo di questa razza, similmente al capello umano, presenta un ciclo di tipo anagenico, ovvero con peli in continua crescita; quindi i Barboncini toys non hanno praticamente nessun follicolo "ibernato" in forma Telogenica per un periodo prolungato di tempo. Da queste osservazioni ci aspettiamo che questa razza sia particolarmente sensibile alle restrizioni alimentari, andando incontro anche a condizioni di ipotrichia o alopecia carenziali.

Recentemente sono stati individuati i geni responsabili della "crescita continuata" del pelo in topi di tipo "an-gora".<sup>(17)</sup>

Esiste quindi la possibilità che anche nei Barboncini vi possa essere un gene o un analogo che svolga una funzione inibitrice il normale meccanismo di crescita su base "telogenica" del pelo, tipico di molte altre specie canine. In questo caso quindi, una dieta ricca o carente potrebbe rappresentare il fattore di stimolo o di depressione dell'attività di tale gene.

Infine, traendo spunto dai nostri risultati, si potrebbe ipotizzare l'uso della sola valutazione esterna del pelo tramite le analisi con DermScop, test del taglio del pelo e OFDA al fine di determinare il coefficiente di crescita del pelo. È però prematuro, basandosi soltanto sulla bontà di questi tests, ipotizzare la possibilità che questi possano arrivare a rimpiazzare totalmente il test di biopsia cutanea ed esame istologico nella valutazione della bontà del pelo e la sua salute. Ad oggi, l'esame delle biopsie cutanee, specialmente quando sezionate orizzontalmente, per la valutazione dello stato del pelo ma soprattutto per la valutazione della morfologia e della fase del follicolo pilifero, non è mai stata presa in considerazione. La biopsia cutanea rimane la via migliore per determinare il numero dei follicoli piliferi e delle unità follicolari e rimane l'unica via per determinare il rapporto anagen/telogen tra questi.

Questo articolo è stato pubblicato in *Recent Advances in Canine and Feline Nutrition*, Vol. III: 2000 Iams Nutrition Symposium Proceedings. Wilmington, OH: Orange Frazer Press, 2000.

## BIBLIOGRAFIA

1. Badura L.L., Goldman B.D.: Prolactin-dependent seasonal changes in pelage: role of

- the pineal gland and dopamine. *Journal of Experimental Zoology*, 1992, 261, 27-33.
2. Baxter B.P., Brims M.A., Taylor T.B.: Description and performance of the optical fibre diameter analyser. *J Text Ins*, 1992, 83, 507-526.
  3. Botchkarev V.A., Metz M., Botchkareva N.V., Welker P., Lommatzsch M., Renz H., Paus R.: Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as "Epitheliotrophins" in murine skin. *Laboratory Investigation*, 1999, 79, 557-572.
  4. Bradfield R.B., Bailey M.A., Margen S.: Morphological changes in human scalp hair roots during deprivation of protein. *Science*, 1967, 157, 438-439.
  5. Buffington C.A.T.: Nutrition and the skin. *Proc (Atti)*, 11th Annual Kal Kan Symposium, Vernon, CA, 1987, 11-16.
  6. Choudhry R., Hodgins M.B., van der Kwast T.H., Brinkmann A.O., Boersma W.J.: Localization of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry: implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. *Journal of Endocrinology*, 1992, 133, 467-475.
  7. Credille K.M., Petersen A.D., Nachreiner R.F., Butler K.L., Zitzow L., Dunstan R.W.: Hair follicle morphology and cell proliferation assessment in canine hypothyroidism. *Proc. (Atti)*, American Association of Veterinary Dermatology 13th Annual Meeting, 1997, 82.
  8. Danilenko D.M., Ring B.D., Pierce G.F.: Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Molecular Medicine Today*, 1996, 460-467.
  9. Danilenko D.M., Ring B.D., Yaragihara D., Benson W., Wiemann B., Starnes C.O., Pierce G.F.: Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia. *American Journal of Pathology*, 1995, 147, 145-154.
  10. Dunstan R.W.: The structure and function of skin. In: Melman SA: *Skin Diseases of Dogs and Cats. DermaPet*, 1994, 15-25.
  11. Ebling F.J.G.: The hormonal control of hair growth. In: Orfanos C.E., Happle R.: *Hair and Hair Diseases*. Springer-Verlag, Berlin, 1990, 267-299.
  12. Feldman E.C., Nelson R.W.: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1987, 68-117.
  13. Freinkel R.K.: Cutaneous manifestations of endocrine diseases. In: Fitzpatrick T.B., et al. eds: *Dermatology in General Medicine*. McGraw Hill, New York, 1993, 2113-2130.
  14. Hamilton J.B.: Male hormone stimulation is prerequisite and an incitement in common baldness. *American Journal of Anatomy*, 1942, 71, 451.
  15. Hansen L.A., Alexander N., Hogan M.E., Sundberg J.P., Dlugosz A., Threadgill D.W., Magnuson T., Yuspa S.H.: Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *American Journal of Pathology*, 1997, 150, 1959-1975.
  16. Hardy M.H.: The secret life of the hair follicle. *TIG*, 1992, 8, 55-61.
  17. Headington J.T.: Transverse microscopic anatomy of the human scalp. *Archives of Dermatology*, 1984, 120, 449-456.
  18. Hébert J.M., Rosenquist T., Götz J., Martin G.R.: FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*, 1994, 78, 1017-1025.
  19. Hoffmann R., Eicheler W., Wenzel E., Happle R.: Interleukin-1 $\beta$ -induced inhibition of hair growth is mediated by cyclic AMP. *Journal of Investigative Dermatology*, 1997, 108, 40-42.
  20. Hordinsky M.K., Ericson M.: Hair innervation and vasculature. *Experimental Dermatology*, 1999, 8, 314.
  21. Jindo T., Tsuboi R., Takamori K., Ogawa H.: Local injection of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) alters cyclic growth of murine hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 1998, 110, 338-342.
  22. Kemppainen R.J., Clark T.P.: Etiopathogenesis of canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 1994, 24, 467-475.
  23. Kozłowska U., Blume-Peytavi U., Kodelja V., Sommer C., Geordt S., Majewski S., Jablonska S., Orfanos C.E.: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in various compartments of the human hair follicle. *Archives of Dermatological Research*, 1998, 290, 661-668.
  24. Luetkeke N.C., Phillips H.K., Qiu T.H., Copeland N.G., Earp H.S., Jenkins N.A., Lee D.C.: The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes & Development*, 1994, 8, 399-413.
  25. Lupton C.J.: Standard deviation of fiber diameter and other characteristics of United States wool. *Sheep and Goat Research Journal*, 1995, 3, 11-121.
  26. Mann G.B., Fowler K.J., Gabriel A., Nice E., Williams R.L., Dunn A.R.: Mice with a null mutation of the TGF $\alpha$  gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell*, 1993, 73, 249-261.
  27. Messenger A.G.: The control of hair growth: an overview. *Journal of Investigative Dermatology*, 1993, 101, 4-9.
  28. Miettinen P.J., Berger J.E., Meneses J., Phung Y., Pedersen R.A., Werb Z., Derynck R.: Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, 1995, 376, 337-341.
  29. Moore G.P.M., Panaretto B.A., Robertson D.: Effects of epidermal growth factor on hair growth in the mouse. *Journal of Endocrinology*, 1981, 88, 293-299.
  30. Mosier J.E.: Relationships of nutrition and skin problems. *Modern Veterinary Practice*, 1979, 11, 105-112.
  31. Oliver R.F.: Histological studies of whisker regeneration in the hooded rat. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, 1966, 16, 231-244.
  32. Peus D., Pittelkow M.R.: Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatology Clinic*, 1996, 114, 559-572.
  33. Philpott M.P., Sanders D., Westage G.E., Kealey T.: Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *Journal of Dermatology Science*, 1994,

- 55-72.
34. Preedy V.R., McNurlan M., Garlick P.J.: Protein synthesis in skin and bone of the young rat. *British Journal of Nutrition*, 1983, 49, 517-523.
  35. Randall V.A., Thornton M.J., Hamada K., Messenger A.G.: Mechanism of androgen action in cultured dermal papilla cells derived from human hair follicles with varying responses to androgens in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 1992, 98, 86-91.
  36. Reis P.J., Sahl T.: The nutritional control of the growth and properties of mohair and wool fibers: a comparative review. *Journal of Animal Science*, 1994, 72, 1899-1907.
  37. Rosenquist T.A., Martin G.R.: Fibroblast growth factor signaling in the hair growth cycle: expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle. *Dev Dyn*, 1996, 205, 379-386.
  38. Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E.: Muller & Kirk's: *Small Animal Dermatology*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1995, 691-703.
  39. Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E.: Muller & Kirk's: *Small Animal Dermatology*. Harcourt Brace & Company, Philadelphia, 1995, 890-901.
  40. Shimaoka S., Tsuboi R., Jindo T., Imai R., Takamori K., Rubin J.S., Ogawa H.: Hepatocyte growth factor/scatter factor expressed in follicular papilla cells stimulates human hair growth in vitro. *Journal of Cell Physiology*, 1995, 165, 333-338.
  41. Soma T., Ogo M., Suzuki J., Takahashi T., Hibino T.: Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles in vivo and in vitro. *Journal of Investigative Dermatology*, 1998, 11, 948-954.
  42. Stenn K.S., Combates N.J., Eilertsen K.J., Gordon J.S., Pardinias J.R., Parimoo S., Prouty S.M.: Hair follicle growth controls. *Dermatology Clinic*, 1996, 14, 543-558.
  43. Taylor M., Shcroft A.T.T., Westgate G.E., Gibson W.T., Messenger A.G.: Glycosaminoglycan synthesis by cultured human hair follicle dermal papilla cells: comparison with non-follicular dermal fibroblasts. *British Journal of Dermatology*, 1992, 126, 479-484.
  44. Watson T.D.G.: Diet and skin disease in dogs and cats. *Journal of Nutrition*, 1998, 128, 2783-2789.
  45. Whiting D.A., Howsden F.L.: *Color Atlas of Differential Diagnosis of Hair Loss*. Cedar Grove, NJ: Canfield Publishing, 1996.
  46. Whiting D.A.: Diagnostic and predictive value of horizontal section of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *Journal of American Academic Dermatology*, 1993, 28, 755-763.
  47. Winn-Elliott M.W., Dunstan R.W., Slocombe R.F.: A comparative study of the morphologic features of porcupine, hedgehog and echidna quills and quill follicles. *Proc. (Atti). American Association of Veterinary Dermatology 12th Annual Meeting*, 1996, 59.
  48. Wykes L.J., Fiorotto M., Burrin D., Del Rosario M., Frazer M.E., Pond W.G., Jahoor F.: Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. *Journal of Nutrition*, 1996, 23, 1481-1488.

# il controllo dell' iperadrenocorticismo (Cushing) del cane

SEMPLICE

RAPIDO

CON EFFETTO  
REVERSIBILENESSUN EFFETTO  
CITOTOSSICOAlime  
amodo.it

MARCHIO REGISTRATO

new

Ora disponibile la nuova  
confezione da 10 mg

322.3M06

Milano

Via Michelangelo Buonarroti, 23  
20093 • Cologno Monzese  
Tel. 0225101 • Fax 022510500JANSSEN  
ANIMAL HEALTH