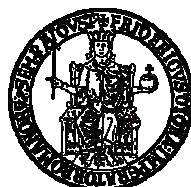


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**

**Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali**

**Sezione di Clinica Medica**



**Dottorato di Ricerca in Scienze Cliniche e Farmaco-Tossicologiche**

**Veterinarie**

**(Coordinatore: Prof. Paolo Ciaramella)**

**Impiego dell'ultrasonografia vescicale e della cistoscopia in  
bovini affetti da ematuria enzootica cronica (EEC):  
due tecniche diagnostiche a confronto**

**Docente Guida:**

**Tesi di dottorato della:**

**Ch.mo Prof. Diego Piantedosi**

**D.ssa Angela De Rosa**

**XXVII CICLO**

**2012-2014**

## INDICE

Indice delle Tabelle e delle Figure:.....	- 1 -
Elenco delle Abbreviazioni:.....	- 4 -
Riassunto .....	- 6 -
Abstract .....	- 10 -
Introduzione .....	- 15 -
<b>PARTE GENERALE .....</b>	<b>- 27 -</b>
1    Eziologia e patogenesi dell'Ematuria Enzootica Cronica.....	- 28 -
1.1    Caratteristiche della ptaquiloside.....	- 29 -
1.2    L'azione del dienone (APT) nei confronti di composti organici .....	- 31 -
1.3    Alchilazione e clivaggio nei confronti del DNA.....	- 31 -
2    Cancerogenesi del Papillomavirus nella insorgenza del cancro vescicale.....	- 36 -
2.1    BVP2_ E5 .....	- 43 -
3    Esame clinico e diagnostica di laboratorio.....	- 45 -
3.1    Sintomatologia clinica e decorso.....	- 45 -
3.2    Esami di laboratorio .....	- 49 -
4    Diagnostica per immagini delle basse vie urinarie del bovino: .....	- 51 -
4.1    Cenni di anatomia della regione pelvica .....	- 51 -
4.2    L'esame ecografico delle vie urinarie del bovino.....	- 64 -
4.3    Cistoscopia.....	- 71 -
5    Reperti istologici e quadro necroscopico .....	- 76 -
6    Emostasi e funzione endoteliale in animali affetti da EEC.....	- 83 -
7    Cenni sul ruolo svolto dal sistema emocoagulativo .....	- 94 -
<b>PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>- 99 -</b>
Materiali e metodi .....	- 100 -
Risultati .....	- 108 -
<b>BIBLIOGRAFIA: .....</b>	<b>- 122 -</b>

## **Indice delle Tabelle e delle Figure:**

**Tab.1** - Localizzazione delle principali lesioni in merito al gruppo filogenetico di appartenenza.

**Tab.2** -Classificazione morfologica dei tumori uroteliali bovini in accordo con la classificazione morfologica dei tumori uroteliali umani 2004, World Health Organization (WHO), Roperto et al. 2009).

**Tab.3** - Scala del dolore utilizzata.

**Tab.4** - Risultati istologici dei prelievi biotici di bovini affetti da EEC.

**Fig.1** - Pteridium aquilinum maschio.

**Fig.2** - Felce aquilina nel periodo autunnale.

**Fig.3**- Distribuzione nazionale della felce aquilina

**Fig.4**- Pteridium esculentum

**Fig.5**- struttura chimica dello ptaquiloside

**Fig.6**- Schema rappresentante la relazione tra BVP-2 e felce aquilina nell'eziopatogenesi dei tumori vescicali dei bovini affetti da EEC

**Fig.7**- Albero filogenetico e classificazione dei papilloma virus bovini

**Fig.8**- Organi pelvici dopo rimozione dell'arto pelvico, della metà sinistra del bacino, e della parete addominale.

**Fig.9**- Apparato genitale femminile e veduta del meato uretrale esterno.

**Fig.10**- Scansione ecografica trasversale di una vescica di bovino sano

**Fig.11**- Scansione ecografica longitudinale di una vescica di bovino sano.

**Fig.12-** Sezione necroscopica di una vescica di bovino affetto da EEC: la mucosa appare ispessita ed irregolare, sono evidenti fenomeni iperemici ed emorragici.

**Fig.13-** Apparecchio ecografico portatile utilizzato per lo studio della vescica di bovini affetti da EEC.

**Fig.14-**Esecuzione di un esame ecografico vescicale per via trans rettale in bovine con EEC.

**Fig.15-**Endoscopio rigido (Karl Storz, Germany), con sistema ottico e di registrazione, utilizzato per lo studio della vescica in bovine con EEC.

**Fig.16-**Esecuzione di un esame cistoscopio in bovine con EEC

**Fig.17-** Pinza da biopsia con apertura bilatare per sistema di visione a 30°

**Fig.18-** Bovino affetto da EEC :Evidente dimagrimento ed ipotrofia muscolare

**Fig.19-** Bovino affetto da EEC si noti l'evidente ematuria.

**Fig.20-**Scansione longitudinale mediana della vescica di un bovino con EEC: si noti l'aspetto polipoide della mucosa vescicale.

**Fig. 21-** Scansione longitudinale mediana della vescica di un bovino con EEC:si noti l'ispessimento diffuso della parete vescicale e la presenza di una lesione di tipo vegetante.

**Fig.22-** Linfonodo iliaco in un bovino con EEC: si noti l'aumento delle dimensioni, i margini irregolari e l'ecostruttura disomogenea.

**Fig.23-**Esame cistoscopico in un bovino con EEC: si noti l'accentuazione della trama vascolare e la presenza di una lesione bottoniforme rossastra

**Fig.24-** Esame cistoscopico in un bovino con EEC: sono evidenti diverse lesioni di natura proliferativa

**Fig.25-** Visione all'esame cistoscopico di una lesione proliferativa con aspetto vegetante risultata localizzata a livello della volta della vescica con concomitante prelievo bioptico.

**Fig. 26-**Urotelio normale- H&E;40x

**Fig.27-**Carcinoma in situ- H&E;40x

**Fig.28-**Displasia- H&E;20x

**Fig.29-**Angiomi- H&E;10x

**Fig.30-**Carcinoma infiltrante a basso grado di invasività- H&E;20X

**Fig.31-**Carcinoma endoluminale- H&E;20x

**Fig.32-**Carcinoma sarcomatoide- H&E;40x

## **Elenco delle Abbreviazioni:**

**12(S)-HETE:** enzima metabolizzante l'acido arachidonico

**2-LOX:** 12-lipossigenasi

**AG:** apparato di golgi

**ALP:** fosfatasi alcalina

**ALT:**amino transferasi

**APC:** proteina C attiva

**APT:** actived ptaquiloside

**APTT:** tempo di tromboplastina parziale attivata

**AST:**aspartato amino transferasi

**AT-III:** antitrombina III

**BCS:**body condition score

**BVP:** papilloma virus bovino

**BVP-1:**papillomavirus bovino tipo 1

**BVP-2:**papilloma virus tipo2

**BVP-3:**papilloma virus tipo3

**BVP-4:**papilloma virus tipo4

**BVP-5:**papilloma virus tipo5

**BVP-6:** papilloma virus tipo6

**CID:** coagulazione intravasale disseminata

**CP:** cancer procoagulant

**CPK:** creatinifosfochinasi

**Delta-PV:** deltapapillomavirus

**EEC:** ematuria enzootica cronica

**EOG:** esame obiettivo generale

**GGT** :gamma glutamil trans peptidasi

**GLA:** acido gamma carbossiglutammico

**H&E:** colorazione ematossilina e eosina

**IL-1 $\beta$ :** interleuchina 1

**LDH:** transaminasi lattico deidrogenasi

**PAI:** inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno

**PAI-1:** inibitore del plasminogeno

**PT:** tempo di protrombina

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PUNLMP:** neoplasie papillari a basso grado di malignità

**PVs:** Papillomavirus

**RE** reticolo endoplasmatico

**TF:** fattore tissutale

**TFPI:** inibitore della via del fattore tissutale

**TFPI:** tissue factor pathway inhibitor

**TM:** trombomodulina

**TNF- $\alpha$ :** fattore di necrosi tumorale

**tPA:** attivatore tissutale del plasminogeno

**u-PA:** attivatore dell' u-plasminogeno

**WHO:** World Health Organization

**Xi-PV:** Xipapillomavirus

## **Riassunto**

L'Ematuria Enzootica Cronica (EEC) del bovino è una sindrome a decorso cronico di natura non infettiva, caratterizzata generalmente da lesioni neoplastiche della parete vescicale associata ad ematuria intermittente ed anemia.

Numerosi studi eziopatogenetici hanno evidenziato che, alla base di tale affezione, è presente una intossicazione cronica da felce aquilina; il potere immunosoppressivo e mutageno dovuto alle sostanze carcinogenetiche contenute nella felce favorisce la replicazione di Papillomavirus, in particolare del BVP-2, a livello della parete vescicale con lo sviluppo di neoplasie a carico della stessa.

La sindrome colpisce soprattutto animali al pascolo e rappresenta sicuramente una problematica ambientale che interessa aree estese soprattutto dell'Italia collinare centro-meridionale, particolarmente ricche di felce.

L'importanza della patologia risiede non solo nelle perdite economiche legate allo scadimento produttivo della mandria e alla morte degli animali, ma anche alla possibilità di trasmissione di fattori pro-oncogeni all'uomo, inseguito all'ingestione di prodotti lattiero-caseari provenienti dal latte di animali malati.

Dal punto di vista clinico, la sindrome evolve più frequentemente in forma cronica, e si presenta con ematuria intermittente associata a deperimento lento e continuo che si manifesta in diversi mesi o anni; per tale motivo la diagnosi della malattia, in passato, veniva per lo più eseguita post-mortem. Attualmente la possibilità di utilizzare tecniche di diagnostica per immagini quali l'ecografia e la cistoscopia permette di



effettuare una diagnosi in vitam con vantaggi per l'allevatore e per il consumatore.

Il presente lavoro di ricerca ha confrontato due tecniche di diagnostica per immagini, l'ultrasonografia vescicale e la cistoscopia, al fine di verificare i loro punti di forza e i loro limiti per la diagnosi di EEC, in modo da fornire al medico buiatra linee guida per un corretto approccio diagnostico alla patologia.

Lo studio ha previsto una fase reclutamento in cui 230 bovine podoliche provenienti da territori ricchi di felce aquilina sono state sottoposte a screening di massa attraverso l'esame delle urine con strisce reattive, al fine di svelare la presenza di ematuria. Al termine di tale fase sono state selezionate 24 vacche podoliche, di età compresa tra i 5 e 12 anni affette da EEC.

I soggetti sono stati sottoposti ad esame clinico completo ed indagini ematologiche e ematobiochimiche di routine che hanno rilevato la presenza di macroematuria in 18 soggetti e microematuria nei rimanenti 6, associate ad anemia normocitica e ipocromica.

Successivamente gli animali, adeguatamente contenuti, sono stati sottoposti ad esame ultrasonografico della vescica per via transrettale e ad esame cistoscopico. Inoltre, durante l'esecuzione delle due tecniche di diagnostica, è stato valutato il grado di tolleranza degli animali alle manovre mediante una scala del dolore modificata.

L'esame ultrasonografico mostrava in tutti i soggetti un ispessimento più o meno localizzato della parete vescicale, associato negli animali con macroematuria a lesioni proliferative di aspetto polipoide e/o vegetante.

L'esame cistoscopico ha permesso di evidenziare una mucosa edematosa, corrugata ed opaca, unitamente alla presenza di aree piatte o bottoniformi di colorito rosso-nerastro; nei bovini con evidente ematuria

erano inoltre presenti neoformazioni vegetanti e/o di aspetto polipoide endoluminali.

L'esame biotico eseguito in tutti gli animali con l'ausilio della cistoscopia ha evidenziato la prevalenza di carcinoma in situ in 18 animali, 2 displasie di cui una associata ad angioma e l'altra a carcinoma infiltrante di basso grado di invasività, tre carcinomi endoluminali e una forma sarcomatoide.

Delle due tecniche diagnostiche impiegate, l'esame ultrasonografico si è dimostrato di semplice esecuzione, rapido e ben tollerato, ma non in grado di fornire precise informazioni relative alla stadiazione delle lesioni osservate, sebbene risulti indispensabile per la valutazione dei linfonodi regionali, talvolta coinvolti nel processo morboso. La tecnica endoscopica ha evidenziato, invece, una notevole sensibilità diagnostica, svelando in tutti i soggetti arruolati una condizione di EEC, indipendentemente dalla fase evolutiva della malattia e dal grado di ematuria presente, permettendo inoltre l'esecuzione di prelievi biotici mirati. I principali svantaggi nell'impiego di tale tecnica diagnostica risiedono nell'elevato costo dell'attrezzatura, talora non accettabile nella comune pratica di campo, indagine della metodica e scarsa praticità nel trasportare le attrezzature in luoghi spesso impervi e poco accessibili.

In considerazione di quanto osservato, il rilievo di macroematuria anche in un solo soggetto dovrebbe portare il medico buiatra a valutare tutti gli animali che condividono il pascolo, attraverso un semplice screening rappresentato dall'impiego di strisce reattive per l'esame delle urine. Tale metodica consente di svelare le insidiose forme occulte caratterizzate da una minima quantità di sangue nelle urine, che rappresenta il primo segno clinico di malattia. Successivamente gli animali positivi devono essere sottoposti ad un esame

emocromocitometrico per valutare il grado di anemia, nonché ad indagini ematobiochimiche per indagare la funzionalità epato-renale. Il “diagnostic-plane” dell’EEC deve successivamente prevedere l’impiego dell’ultrasonografia transrettale, con valutazione dell’intero apparato urinario, nonché dei linfonodi lomboaortici e iliaci.

Nel caso di estese lesioni a carattere proliferativo associate a macroematuria, è necessario predisporre la macellazione del soggetto, mentre gli animali con solo ispessimento, più o meno circoscritto, della parte vescicale associato a microematuria, dovrebbero essere allontanati dai pascoli infestati e successivamente sottoposti a controlli semestrali, al fine di verificare una eventuale progressione/involuzione delle lesioni riscontrate. In questi ultimi può essere utile l’impiego della cistoscopia, nonostante i limiti oggettivi legati ai costi e alla scarsa praticità sui pascoli o in zone difficilmente accessibili. L’applicazione della cistoscopia comunque consente di studiare le lesioni attraverso il prelievo bioptico e quindi di formulare una prognosi più corretta.

In conclusione la corretta applicazione di un protocollo diagnostico che preveda l’utilizzo di entrambe le metodiche utilizzate può, indubbiamente, portare ad una riduzione considerevole delle forme di EEC invalidanti, riducendone così l’impatto economico negativo sulle realtà zootecniche di nicchia che rappresentano un valore di biodiversità da tutelare.

## **Abstract**

Chronic Enzootic Hematuria (CEH) is a chronic non infectious diseases of bovines, characterized by neoplastic lesions of the urinary bladder associated with intermittent hematuria and anemia.

Etiopathogenetic studies showed that a chronic intoxication by bracken fern is responsible of this pathological condition. The carcinogenic substances contained in this plant promote replication of papillomavirus, in particular of the BVP-2, at the level of the urinary bladder wall with the development of cancer.

The syndrome affects mainly grazing animals and represents certainly an environmental problem because is widespread to mountainous and hilly areas of southern and central Italy. The importance of the disease is due not only to the economic losses for the farmers, but also to the possibility of transmission of oncogenic factors to human population through the ingestion of milk and dairy products derived from animals with CEH.

The syndrome develops most frequently in chronic form, and the bovines show intermittent hematuria, associated with slow and continuous weight loss that occurs in several months or years; for this reason, in the past the diagnosis of the disease was mostly performed at post-mortem examination. Currently, the possibility of using diagnostic imaging techniques, such as ultrasonography and cystoscopy, allows to make a diagnosis *in vitam*.

The aim of the present research is to compare two diagnostic imaging techniques, urinary bladder ultrasonography and cystoscopy, in order to verify their effectiveness and limitation in the diagnosis of CEH,

and provide to large animals veterinarians guidelines for a correct diagnostic approach to this syndrome.

In the first step 230 bovines of Podolica breed, grazing in areas infested by bracken fern, were subjected to a screening through urine test strips, in order to reveal the presence of microhematuria. At the end of this phase 24 cows affected by CEH, aged between 5 and 12 years, were selected.

The animals were subjected to a complete clinical examination, urine exam and common hematological and hematochemical analysis. At the time of presentation 18 animals showed macrohematuria and 6 microhematuria, while all animals had normocytic normochromic anemia. Thereafter, the animals were subjected to transrectal ultrasound examination of the urinary bladder and cystoscopy. Moreover, during the execution of these diagnostic techniques, has been rated the degree of tolerance of the animals using a modified scoring system for pain.

The ultrasound examination in all subjects showed a more or less localized thickening of the urinary bladder wall, associated in animals with macrohematuria to proliferative lesions with a polypoid/vegetating appearance. Cystoscopic examination revealed an edematous, wrinkled and dull mucosa of the urinary bladder, together with the presence of raised and flat areas, as buttons, of blackish-red color; in cattle with macrohematuria were also present more large proliferative lesions pedunculated or with a broad base.

Histopathology performed on biopsy specimens sampled during cystoscopic examination showed the prevalence of in situ carcinoma in 18 animals, 2 dysplasias associated with angioma and infiltrating carcinoma of low degree of invasiveness respectively, 3 endoluminal carcinomas and a sarcomaoid form.

Of the two diagnostic techniques employed, the ultrasound examination has proved simple to perform, not time-consuming and well tolerated, but not able to provide accurate information regarding the degree of the observed lesions, although it is needful for evaluation of regional lymph nodes, sometimes sites of metastatic lesions. Instead, the endoscopic technique has shown, however, a remarkable diagnostic sensitivity, revealing in all subjects a condition of CHE, regardless of the developmental stage of the disease and the degree of hematuria, also allowing biopsy from selected areas of urinary bladder. The main disadvantages of cystoscopy are represented by the high cost of the equipment, duration of the procedure and difficulty in transporting the equipment in poor access areas.

The evidence macrohematuria in one subject should lead the veterinarian to evaluate all animals that grazing together, through a simple screening represented by the use of urine test strips. This method allows to reveal the insidious subclinical forms of CHE characterized by a minimal amount of blood in the urine. Subsequently positive animals must be subjected to a blood cell count in order to assess the degree of anemia, as well as to a hematochemical panel in order to investigate the hepatic and renal function. The "diagnostic-plane" must then provide for the use of transrectal ultrasonography with evaluation of the entire urinary tract, as well as regional lymph nodes.

In the case of extensive proliferative lesions associated with macrohematuria, it is necessary to slaughter the animals, while bovines with only, more or less circumscribed, thickening of the urinary bladder associated with microhematuria, should be removed from infested areas, and subsequently subjected to a check every six months, in order to verify a the progression / regression of the disease. In these latter animals

may be useful cystoscopy, despite the objective limits related to costs and impractical in transporting on grazing lands. The application of cystoscopy still allows to study lesions through a biopsy and then to formulate a more accurate prognosis.

In conclusion, the correct application of a diagnostic protocol that provides for the use of both diagnostic methods can lead to a considerable reduction of CHE incidence, thus reducing the negative economic impact on livestock reality of hilly and mountainous areas.

## **INTRODUZIONE**



## **Introduzione**

Nel settore buiatico le affezioni primarie delle basse vie urinarie sono comunemente sottostimate e scarsamente considerate come cause di ridotta produttività delle mandrie, nonostante spesso siano associate a scadimento delle condizioni generali del soggetto (*Monaghan e Hannan, 1983*). In particolare le neoplasie a carico della vescica urinaria rappresentano un'evenienza alquanto rara essendo lo 0,001% di tutte le neoplasie maligne riscontrate nel bovino (*Meuten, 2002*). Nella maggior parte dei casi, tali affezioni si manifestano sotto forma di ematuria, assumendo spesso un andamento cronico ingravescente. Tra queste sicuramente un ruolo di primaria importanza è rappresentato dall'Ematuria Enzootica Cronica (EEC), una sindrome, di natura non infettiva, caratterizzata generalmente da lesioni neoplastiche della parete vescicale, associata ad ematuria più o meno evidente ed anemia.

Negli ultimi decenni numerosi studi hanno dimostrato come l'assunzione ripetuta di felce aquilina (*Pteridium aquilinum*) unitamente all'infezione da Papilloma virus (BPV-2) siano i principali agenti eziologici responsabili di tale sindrome (*Campo et al, 1992*).

La felce aquilina (*Pteridium aquilinum*) (Fig.1) è una pianta cosmopolita contenente numerose sostanze immunosoppressive, clastogene e carcinogenetiche (Smith et al., 1997; Alonso-Amelot et al., 2002; Yamada et al., 2007).



**Fig.1:** *Pteridium aquilinum* maschio.

Essa, appartenente alla classe delle Pteridopsida, famiglia Pteridaceae, è una delle cinque piante più comuni al mondo, diffusa in tutte le aree temperate e subtropicali sia dell'emisfero settentrionale sia di quello meridionale; è una pianta erbacea perenne di notevole sviluppo che può raggiungere i due metri di altezza, provvista di un grosso rizoma strisciante da cui emergono le fronde annuali di profilo triangolare il cui colore varia da giallo-verde a verde-rossastro nel periodo autunnale (Fig.2). Le fronde sono lunghe fino ad un metro con una larghezza che può superare i 50 cm; le spore (sori) sono disposte sui bordi delle foglie

protetti dall'orlo della foglia stessa ripiegato; la sporificazione ha inizio in tarda primavera e si protrae per tutta la stagione calda. Nel nostro paese essa risulta essere presente su tutto il territorio nazionale, isole comprese, fino a circa 2000 metri di altitudine; la sua distribuzione è presente maggiormente nelle aree deforestate a partire da pascoli semi-abbandonati che hanno subito un ritorno alla vegetazione naturale; in tali terreni, infatti, può dare origine ad estese e fitte coperture fino a diventare un vera e propria pianta infestante (*Taylor., 1990*). (Fig. 3)



**Fig.2:** Felce aquilina nel periodo autunnale.



**Fig.3:** Distribuzione nazionale della felce aquilina.

Inizialmente, *Pteridium aquilinum* è stato considerato come singola specie vegetale, ma in realtà, le sono state attribuite diverse sottospecie (Tryon, 1941): *aquilinum* distribuita a livello dell'emisfero settentrionale con le varietà *decompositum*, *pubescens*, *feei*, *latiusculum*, *wrightianum*, *pseudocaudatum* ed *africanum*, e la sottospecie *caudatum*, distribuita nell'emisfero meridionale, comprende le varietà *caudatum*, *arachnoideum*, *revolutum*, *yarrabense* ed, infine, *esculentum* (Fig. 4)(Tryon, 1941; Taylor, 1990; Smith et al., 1994).

Come già accennato, la felce contiene numerose sostanze immunosoppressive, mutagene, clastogene ed anche carcinogenetiche, tra queste ultime la più importante è sicuramente il glicoside

sesquiterpenoide, isolato per la prima volta nel 1983 in Giappone e nei Paesi Bassi (*Niwa et al., 1983; Van der Hoeven et al., 1983*).



**Fig.4:** Pteridium esculentum.

I primi studi circa il potenziale effetto carcinogenetico da parte della felce maschio sono stati riportati nel lontano 1960 da Rosenberger ed Heeschen, i quali descrissero condizioni neoplastiche di tipo polipoide a carico della vescica associate a fenomeni di ematuria in bovini alimentati per lunghi periodi con tale pianta. Nel 1965, studi sperimentali su animali da laboratorio misero in evidenza la sua tossicità associata ad un alto potenziale carcinogenetico (*Evans e Mason, 1965*). Nel decennio successivo, l'ematuria enzootica è stata riprodotta sperimentalmente in bovini alimentati con felci appena falciate o stoccate come fieno

(*Pamukcu et al., 1978; Hirono et al., 1984; Shanin et al., 1998*), confermando l'importante ruolo svolto da tale vegetale nella genesi dell'affezione.

Le concentrazioni di ptaquiloside variano a seconda del genotipo del vegetale e talvolta possono raggiungere concentrazioni elevate fino all'1,3% sulla sostanza secca (*Smith et al., 1994*). Alcuni autori hanno suggerito che a seconda della più o meno elevata concentrazione di ptaquiloside e, quindi, del genotipo della felce presente sul territorio, la distribuzione geografica dell'ematuria enzootica può notevolmente variare (*Smith et al., 1998*); infatti, si ritiene che in aree geografiche dove la malattia è presente, la felce contenga una grande quantità di ptaquiloside (300-700 µg/g/s.s. ), mentre in aree dove la malattia non è presente, o assume un carattere sporadico, la concentrazione di tale sostanza risulti inferiore a 100µg/g/s.s. (*Smith et al., 1994*).

Negli ultimi decenni, diversi studi hanno evidenziato negli animali malati una stretta correlazione tra infezione da Papillomavirus (BPV), ingestione di felce e comparsa di neoplasie vescicali.

Come è noto, il Papillomavirus tipo 1 (BPV-1) ed il tipo 2 (BPV-2) appartengono ai Deltapapillomavirus e sono responsabili di fibropapillomi, cioè tumori benigni dell'epitelio e del derma. Il ruolo di BPV-1 o di BPV-2 nella carcinogenesi a livello della vescica urinaria è

stato per la prima volta ipotizzato da Olson nel 1965, il quale aveva dimostrato che la somministrazione di sospensioni di neoplasie vescicali bovine era capace di indurre la formazione di fibropapillomi cutanei e vaginali. Tali ricerche suggerirono, quindi, una possibile condizione simbiotica tra papillomavirus e tumori spontanei a carico della vescica; solo nel 1992 Campo e collaboratori sono riusciti ad isolare il DNA di BPV-2 a livello di neoformazioni a carico della vescica in bovini alimentati con felce, sia in condizioni naturali che sperimentalmente indotte confermando, in tal modo, l'importante ruolo di tale virus nell'oncogenesi della ematuria enzootica (*Campo et al., 1992*); infatti, un possibile meccanismo eziopatogenetico potrebbe prevedere che il papillomavirus sia responsabile di una infezione latente a livello dell'epitelio vescicale e che la contemporanea presenza di sostanze immunosoppressive e carcinogenetiche contenute nella felce possa favorire sinergicamente lo sviluppo di lesioni preneoplastiche (*Campo et al., 1992*).

Nell'ultimo ventennio, diversi ricercatori hanno, inoltre, posto la loro attenzione sulla possibile assunzione da parte dell'uomo di tali sostanze attraverso il latte e i suoi derivati; Villalobos Salazar (1989) ha infatti messo in evidenza una maggiore incidenza di neoplasie dell'apparato



gastroenterico in persone che si alimentano di latte e/o formaggi provenienti da bovini allevati in aree endemiche.

Un recente lavoro ha evidenziato la possibilità del passaggio nel latte prodotto dai soggetti affetti da EEC conseguente all'ingestione di felce, di metaboliti pro-neoplastici, verificando la stretta correlazione tra tumori gastro-esofagei e consumo di prodotti lattiero-caseari (*Shama, 2013*).

L'EEC colpisce numerosi animali della stessa mandria, soprattutto in allevamenti di razze podoliche condotti allo stato brado e semi-brado dell'Italia collinare centro-meridionale, dove la felce risulta particolarmente rigogliosa, allo stadio germinativo, essendo tenera e facilmente commestibile, viene assunta in notevoli quantità dagli animali. I bovini di età superiore ad un anno sono più frequentemente colpiti, senza alcuna predisposizione di età, sesso e razza.

Anche altre specie, come le pecore, esposte ad ingestione di felce per periodi superiori ai due anni, possono contrarre la malattia (*Radostitis et al., 1994*).

Altri autori hanno, inoltre, riscontrato sintomatologia simile e analoghe lesioni anatomopatologiche in altre specie animali, come il bufalo (*Somvanshi, 2011*) e il daino; in quest'ultima specie sono stati riscontrati tumori, quali emangiomi, carcinomi e emangiosarcomi della

vescica, in animali con sintomatologia ascrivibile ad EEC e alimentatesi su pascoli contenenti felce aquilina (*Scala, 2014*).

L'EEC si presenta come problematica ambientale che interessa intere aree con discrete perdite economiche, in considerazione del suo decorso cronico e del carattere letale della malattia; l'affezione non è strettamente associata ad un particolare tipo di terreno, sebbene essa venga più comunemente osservata nelle aree a suolo poco compatto e/o roccioso (*Radostitis et al., 1994*).

Dal punto di vista clinico la malattia evolve in forma subacuta o, più frequentemente, cronica. Nei rari casi ad insorgenza improvvisa gli animali presentano una grave ematuria, spesso associata alla presenza di grossi coaguli, grave astenia, pallore delle mucose e, talvolta, decubito prolungato con morte in 1-2 settimane. Gli episodi a decorso cronico sono caratterizzati da una ematuria intermittente più o meno evidente, deperimento organico lento e continuo, che si manifesta nel corso di diversi mesi o, in alcuni casi, di anni. A causa di infezioni vescicali secondarie, nelle mandrie colpite è più frequente osservare una maggiore incidenza di pielonefriti ascendenti spesso associate a cistiti.

Come sottolineato in precedenza, i rilievi clinici di più frequente riscontro sono rappresentati da: ematuria, dimagrimento e pallore delle mucose, la cui gravità è in funzione del tempo di insorgenza della

malattia. Il fattore temporale è un elemento condizionante le modificazioni del profilo emocoagulativo come dimostrato in un precedente nostro lavoro ( *Di Loria et al, 2012*). In genere l'ematuria assume un carattere di cronicità della durata talvolta di diversi anni; infatti, periodi di apparente assenza di macroematuria fanno erroneamente ritenere l'animale guarito e per tale ragione viene lasciato pascolare liberamente su terreni contaminati, favorendo in tal modo la progressione della malattia. L'organismo risponde con modificazioni dei parametri emostatici che con il tempo possono alterarsi fino alla comparsa, nei casi letali, di forme di coagulazione intravasale disseminata (CID) (*Buntain, 1980*).

Mentre in passato la diagnosi di EEC si basava essenzialmente sull'esame post-mortem, attualmente grazie alle moderne tecniche di diagnostica per immagini, la patologia può essere riconosciuta *in vitam*, con indubbi vantaggi economici per l'allevatore. Nel 2002 Hoque e collaboratori hanno utilizzato l'ultrasonografia per il riconoscimento delle lesioni della parete vescicale in corso di EEC del Bovino già evidenziando gli indubbi vantaggi della tecnica legati alla rapidità di esecuzione dell'esame sia nel maschio che nella femmina, ma anche i suoi limiti dovuti all'incapacità di discriminare tra forme benigne e maligne; limiti superati con l'introduzione della tecnica cistoscopia che

consente il prelievo di campioni bioptici dalle neoformazioni visualizzate con la possibilità di arrivare ad una diagnosi di certezza (Franz, 2004).

In quest'ultimi anni, l'impiego sempre più frequente dell'ultrasonografia vescicale e della cistoscopia ha consentito di compiere notevoli passi in avanti nella stadiazione della malattia, unitamente ad una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici che sono alla base di tale affezione, permettendo una diagnosi precoce e una adeguata valutazione prognostica.

Considerando i notevoli vantaggi che la diagnostica per immagini può portare nello studio della EEC, lo scopo della presente tesi di dottorato, è quello di confrontare due diverse metodiche in bovini naturalmente affetti da tale sindrome: l'ultrasonografia vescicale e la cistoscopia. Nel contempo dall'analisi delle problematiche connesse agli episodi di EEC negli allevamenti condotti allo stato brado e semibrado, ci si è posti altresì l'obiettivo di fornire al medico veterinario buiatra un idoneo piano diagnostico per la corretta gestione della mandria in cui tale sindrome è presente.

La parte sperimentale sarà preceduta da una approfondita disamina su gli aspetti eziopatogenetici, clinico-diagnostici e terapeutici dell' EEC, in base a quanto di più recente riportato nella letteratura veterinaria.

## **PARTE GENERALE**

## **1 Eziologia e patogenesi dell'Ematuria Enzoistica Cronica**

L'eziologia dell'ematuria enzoistica del bovino è plurifattoriale e sembra sia legata all'effetto sinergico delle sostanze cancerogenetiche presenti nella pianta, e del papillomavirus sebbene altre co-cause non possono essere del tutto escluse.

Come già accennato in premessa, la prima segnalazione dell'importanza della felce nel determinismo della malattia risale al 1960 ad opera di Rosenberger ed Heeschen, i quali descrissero neoformazioni polipoidi della vescica associate a fenomeni di ematuria in bovini alimentati per lungo tempo con tale vegetale.

Nel 1965, studi sperimentali su ratti misero in evidenza la tossicità di tale pianta associata ad un alto potenziale carcinogenetico (*Evans e Mason, 1965*). Infatti, i ratti sottoposti a diete contenenti foglie secche di felce sviluppavano adenocarcinomi, e sarcomi multipli intestinali, e/o carcinomi a carico della vescica urinaria; anche l'applicazione sulla cute di ratti bianchi di estratti di urine da bovini nutriti con felce portava allo sviluppo di escrescenze simili a papillomi (*Georgijev et al., 1963*).

Studi sperimentali hanno dimostrato che il tempo di esposizione all'ingestione della felce gioca un ruolo cruciale nell'incidenza dello sviluppo dei tumori; infatti, è stata riscontrata una alta incidenza di

tumori della regione terminale dell'ileo in ratti nutriti con felce per un periodo della durata di almeno 4 mesi, mentre il coinvolgimento della vescica insorgeva in animali alimentati per periodi più lunghi della durata di almeno 8 mesi (*Hirono et al., 1970; 1982; 1983*).

La felce contiene diverse sostanze chimiche ad azione flogogena tra cui le braxina A, B e C, sostanze ad azione immunosoppressiva, mutagena e clastogena come la quercetina (*Bjieldanes e Chang, 1977; Nakayasu et al., 1986*) unitamente a sostanze ad azione carcinogenica quali la ptaquiloside o Aquilide A, un glicoside norsesquiterpenoide capace di indurre clastogenesi in colture cellulari e carcinogenesi sperimentale in vivo (*Smith, 1977; Alonso-Amelot et al., 2002*). Castillo e collaboratori (1998) hanno inoltre isolato da *Pteridium aquilinum*, varietà *caudatum*, un nuovo glicoside sesquiterpenoide tossico, denominato Ptaquiloside Z.

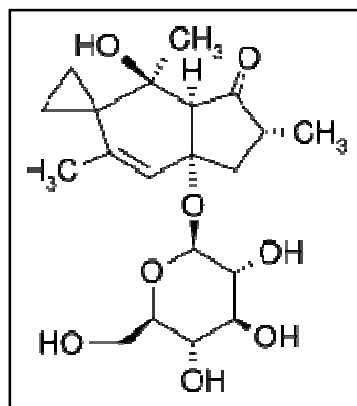
### ***1.1 Caratteristiche della ptaquiloside***

La ptaquiloside è un composto incolore, amorfo, solubile in acqua, metanolo ed etilacetato (*Ojika et al., 1985; Oelrichs et al., 1995*); in atmosfera asciutta essa risulta stabile a temperatura ambiente per più di sei mesi (tra -20° e 0° C), mentre a temperatura

ambiente si decompone in soluzione acquosa in funzione del pH (Yamada et al.,1994).

In soluzione acida, la ptaquiloside va gradualmente incontro ad aromatizzazione con liberazione di D-glucosio e dando origine a Pterosina Be Pterosina O (Fukoka et al., 1978), mentre in soluzione alcalina (pH 8-11) viene rapidamente trasformato, con la concomitante liberazione di D-glucosio, in un dienone (APT, activated ptaquiloside) (Kigoshi et al.,1993); quest'ultima risulta estremamente instabile in soluzione acquosa acida e riconvertita a Pterosina B, mentre si presenta alquanto stabile in soluzione alcalina per almeno 60' (Ojika et al., 1987).

Come è noto, l'ileo e la vescica urinaria del bovino sono organi caratterizzati da un pH alcalino e pertanto costituiscono ambienti ottimali per la formazione dell'APT.



**Fig.5:** Struttura chimica dello ptaquiloside.



## ***1.2 L'azione del dienone (APT) nei confronti di composti organici***

Come già accennato, il dienone generato dalla ptaquiloside in condizioni debolmente alcaline, sembra essere la forma attiva della ptaquiloside ed agisce come potente agente alchilante nei confronti di vari composti nucleofili (es. acqua, alcool, amine) per originare composti aromatici come la pterosina B, (*Ojika et al., 1987*); l'anello ciclopropilico del dienone risulta altamente reattivo come un gruppo elettrofilo in quanto è coniugato ad un chetogruppo e costituisce un sistema carbinol-ciclopropilico, da cui risulta ben nota la facile formazione di un anomalo catione stabile.

## ***1.3 Alchilazione e clivaggio nei confronti del DNA***

E' noto che i danni chimici a carico del DNA causati dagli agenti alchilanti comportino carcinogenesi chimica (*Lawley, 1984*). Gli agenti carcinogenetici sono suddivisi in due categorie: composti che reagiscono direttamente con il DNA o le proteine senza attivazione enzimatica e composti che richiedono attivazione metabolica per generare elettrofilo reattivi, denominati carcinogeni terminali, che

successivamente, possono reagire con il DNA e le proteine. Le proprietà della ptaquiloside indicano che essa è un agente carcinogeno direttamente attivo e che il dienone è il carcinogeno terminale (*Yamada et al., 1994*).

Considerando che la maggior parte dei carcinogeni naturali va incontro ad attivazione metabolica per dare origine ai carcinogeni terminali, la ptaquiloside origina da solo il dienone senza, quindi, alcuna attivazione metabolica.

Nel 1989 e 1994 diversi studi giapponesi hanno approfondito l'interazione tra DNA e dienone: la ptaquiloside causava deboli rotture del DNA, al contrario del dienone il quale esibiva un alto grado di abilità di clivaggio del DNA, (*Yamada et al., 1994*).

La liberazione di glucosio dalla PT risulta essere uno “step” cruciale nel processo di clivaggio del DNA infatti, l'attività di clivaggio di PT diventa forte in condizioni alcaline (*Yamada et al., 1994*).

In condizioni fisiologiche, la reazione tra DNA e dienone origina addotti attraverso N-3 di adenina e/o, a minore proporzione, N-7 di guanina; dopo 25 h a 32°C, avviene il clivaggio spontaneo del legame N-glicosidico a livello delle adenine alchilate per generare siti non basici, i quali risultano molto labili con conseguente rottura

attraverso una reazione di  $\beta$ -eliminazione.

La formazione di addotti tra DNA e dienone è stata riportata da Smith e collaboratori (1994) che hanno evidenziato la sequenza di selettività di alchilazione dei siti di adenina. Risultati simili sono stati ottenuti da Sugiura e Yamada (1998).

Un altro interessante studio è stato condotto in vitelli nutriti con felce che hanno sviluppato neoplasie intestinali conseguenti a processi di carcinogenesi legati alla presenza di addotti del DNA con la ptaquiloside e successiva mutazione a carico del gene H-ras, corrispondente a transizioni adenina a guanina o a trasversioni adenina a pirimidina (T o C) a livello del codone 61 di tale gene (*Prakash et al., 1996*). H-ras è un oncogene oggi ritenuto associato ad alcuni tipi di neoplasie comprese quelle del colon, della vescica urinaria e tumori a carico della ghiandola mammaria (*Peretti et al., 2007*). Recentemente, l'espressione immunohistochimica della proteina codificata da H-ras è stata identificata in vesciche affette da cistite cronica e tumori ed appartenenti a bovini esposti ad ingestione di felce aquilina (*Sardon et al., 2005*).

L'alchilazione in vitro del gene H-ras da parte del dienone avviene principalmente sui siti dell'adenina e la susseguente depurinazione delle adenine alchilate si verifica con un'alta selettività

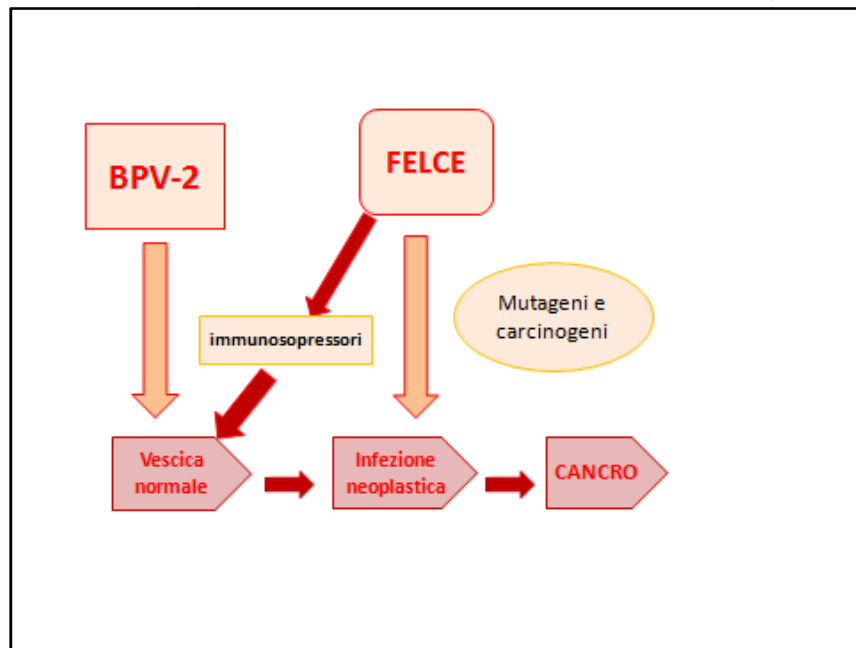
di sequenza; è stato suggerito che l'alchilazione dell'adenina da parte di ptaquiloside sul codone 61 seguita da depurinazione ed alterata sintesi del DNA determini l'attivazione di H-ras a livello intestinale in vitelli alimentati con felce (*Prakash et al., 1996*).

A conferma di quanto riportato, Prakash e collaboratori (1998) hanno successivamente dimostrato la formazione di addotti del DNA con il dienone in ratti trattati con dienone per via endovenosa.

La proteina di H-ras, la p21, è dotata di attività GTP-asi giocando un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare; la p21 così modificata si renderebbe responsabile di eventi iperplaseogeni che condurrebbero le cellule uroteliali ad una condizione di 'iniziazione' e verso una potenziale trasformazione in senso neoplastico.

Sono tutt'oggi in corso studi per comprendere le cause ed i pathways molecolari responsabili della cosiddetta "promozione cancerogenetica della cellula uroteliale iniziata", ma si ritiene che il contemporaneo processo infiammatorio sostenuto da batteri e virus possa essere l'evento chiave nella promozione del tumore (*Lu et al., 2006*) e che, inoltre, i fenomeni immunosoppressivi indotti dalle sostanze presenti nella felce giochino un ruolo centrale nei meccanismi che caratterizzano l'evento (*Campo et al., 1992; Chen et*

al.,2007; Philip et al., 2004; Tan e Coussens, 2007).(Fig. 6).



**Fig.6:** Schema rappresentante la relazione tra BPV-2 e felce aquilina nell'eziopatogenesi dei tumori vescicali dei bovini affetti da EEC.

(Campo et al-1992;Prakash at al-1996;Borzacchiello et al-2001; Borzacchiello et al-2003)

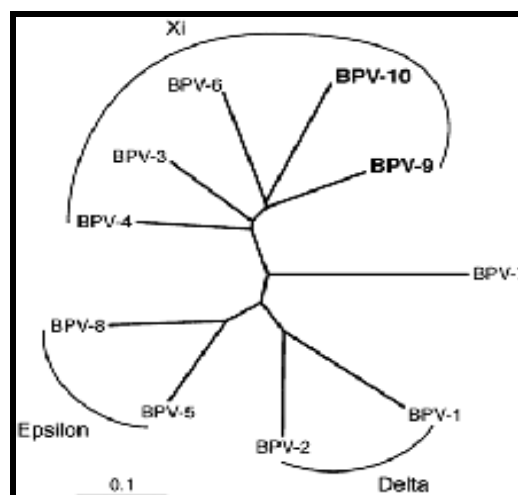
## **2 Cancerogenesi del Papillomavirus nella insorgenza del cancro vescicale.**

I Papillomavirus (PVs) sono una famiglia di virus oncogeni a DNA costituito da un doppio filamento ampiamente distribuiti in natura; sono virus strettamente specie-specifici, anche se sono stati descritti particolari casi di trasmissione tra specie diverse (bovino-cavallo).

Da sempre, i Papillomavirus bovini sono tra i virus animali più studiati proprio per il loro potenziale legame diretto tra infezione virale e neoplasie. Storicamente sono stati identificati sei tipi di BPV e classificati in due sottogruppi: il sottogruppo A, comprendente BPV-1, BPV-2 e BPV-5 che sono comunemente definiti come Fibropapillomavirus, cioè virus che infettano l'epitelio ed il sottostante derma dando origine ai fibropapillomi e il sottogruppo B comprendente BPV-3, BPV-4 e BPV-6, virus puramente epiteliotropici che infettano l'epitelio ed inducono la formazione di veri e propri papillomi (*Campo, 2006*).

I Papillomavirus sono stati recentemente riclassificati(*de Villiers et al., 2004*), in accordo con la nomenclatura dell'alfabeto greco, per cui BPV-3, BPV-4 e BPV-6 sono definiti come Xi-papillomavirus e BPV-1 e BPV-2 come Delta-papillomavirus.

Il genoma di BPV-5 sembra mostrare omologie sia con Xi-PV sia con Delta-PV (Bloch e Breen, 1997) e sembra essere dotato anche di un dualismo nel suo comportamento biologico causando formazione sia di fibropapillomi che di papillomi epiteliali (Bloch et al., 1994), pertanto tali osservazioni hanno portato a riclassificare BPV-5 come singolo membro virale, quale Epsilon-PV genus (de Villers et al., 2004). Studi recenti hanno permesso di sequenziare il genoma completo di altri due BPV, più precisamente, BPV-7 classificato come membro appartenente ad un nuovo gruppo di papillomavirus non ancora designato e l'altro, il BPV-8 classificato come membro del Epsilon-PV genus (Ogawa et al., 2007; Tomita et al., 2007)(Fig.7).



**Fig. 7:** Albero filogenetico e classificazione dei Papillomavirus bovini.  
(da Hatama et al., 2008)

Recentemente sono stati comunque riportati 10 differenti tipi di BVP (*Hatama et al.,2009*), infatti due nuovi BPV sono stati inseriti nel gruppo dei Xi-papillomavirus, e, più precisamente, BPV-9 e BPV-10 isolati da Hatama e collaboratori (2008) lesioni papillomatose squamose dei capezzoli di bovini.

L'infezione da Delta-PV (fibropapillomavirus) porta ad una iniziale trasformazione dei fibroblasti sub-epiteliali seguita da acantosi plessiforme epiteliale e papillomatosi, mentre l'infezione da Xi-PV (epiteliotropici) induce papillomi epiteliali senza coinvolgimento dei fibroblasti (*Jarrett, 1985*).

BPV-1 causa fibropapillomi del capezzolo e del pene; BPV-2 è responsabile dei comuni papillomi cutanei e fibropapillomi esofagei; BPV-4 causa formazione di papillomi del tratto superiore gastrointestinale, BPV-6 di papillomi dei capezzoli e BPV-5 è responsabile di fibropapillomi a grani di riso a livello della mammella (*Campo, 2006*) (Tab. 1).



<b>Tab. 1 - Localizzazioni delle principali lesioni in merito al gruppo filogenetico di appartenenza</b> (Campo, 2006)	
<b>Δ Papillomavirus: (fibropapillomi)</b>	<b>BPV-1:</b> testa, capezzoli, pene <b>BPV-2:</b> testa, dorso
<b>ε Papillomavirus: (misti)</b>	<b>BPV-5:</b> capezzoli, mammelle <b>BPV-8:</b> capezzoli, cute
<b>Ξ Papillomavirus: (papilloma)</b>	<b>BPV-3:</b> dorso <b>BPV-4:</b> tratto superiore GI <b>BPV-6:</b> capezzoli, mammelle <b>BPV-9:</b> capezzoli <b>BPV-10:</b> capezzoli
<b>Nuovo genere:</b>	<b>BPV-7:</b> cute, capezzoli+

I papillomi del tratto superiore gastrointestinale indotti da BPV-4 possono verificarsi in tutti i siti del tratto superiore dell'apparato gastroenterico, dalla lingua fino allo stomaco. Nei bovini sani i papillomi risultano essere rari e normalmente regrediscono dopo circa un anno dalla loro comparsa sebbene in soggetti immunoincompetenti essi tendano a diffondersi. Nel caso di bovini allo stato brado, tale immunosoppressione assume un carattere di cronicità e deriva dall'ingestione di sostanze immunosoppressive contenute nella felce presente nei pascoli (*Campo, 2002; Borzacchiello et al., 2003*). Gli animali che sviluppano estese papillomatosi del primo tratto gastroenterico presentano difficoltà nella prensione degli alimenti e

talvolta della respirazione; anche in casi lievi, gli animali sono, comunque, esposti ad un alto rischio di sviluppare forme di carcinoma a cellule squamose.

La correlazione tra fattori virali, immunologici, chimici e la progressione delle lesioni papillomatose verso forme carcinomatose è stata descritta sia in condizioni naturali che sperimentali (*Jarrett et al., 1978; Campo et al., 1994*). Infatti, animali infettati con BPV-4 ed alimentati con fieni privi di felce sviluppano forme di papillomi che regredivano dopo circa un anno; al contrario, bovini alimentati con felce sviluppavano papillomi con elevato grado di diffusione attraverso l'oro- e nasofaringe e che in alcuni casi davano vita a forme maligne di carcinoma squamoso (*Campo et al., 1994*). Recenti studi hanno ulteriormente confermato una stretta relazione tra papillomavirus (BPV) e *Pteridium aquilinum*: in particolare DNA di papillomavirus tipo 2 (BPV-2) è stato riscontrato nel 69% dei tumori vescicali sperimentalmente indotti ed nel circa il 50% dei tumori in condizioni naturali (*Campo et al., 1992*).

Come già accennato, tale alto grado di associazione tra cancro della vescica e BPV-2 ha suggerito che tale virus giochi un importante ruolo nella carcinogenesi a carico di tale organo (*Campo*

*et al., 1992*), ruolo che può essere esaltato proprio dalla ingestione di felce aquilina (*Campo et al., 1992*). BPV-1/2 infetta l'epitelio della vescica urinaria, forse a partenza da una infezione delle zone paragenitali e/o diffondendo attraverso il sangue (*Campo et al., 1992; Roperto et al., 2008*) e stabilendo un'infezione latente a livello dell'urotelio. In bovini immunocompromessi, alimentati con felce aquilina, infatti, il virus non viene eliminato e l'infezione latente può riattivarsi (*Campo, 1997; 2003; Campo et al., 1994*). Il DNA virale presente a livello delle lesioni vescicali conserva la capacità infettante ed è capace di iniziare un ciclo replicativo a livello di tessuto cutaneo che, al contrario dell'urotelio, si dimostra essere un tessuto “permissivo” alla replicazione virale come evidenziato per la prima volta da Olson nel 1965, tramite l'inoculazione cutanea di estratti di tumori spontanei vescicali bovini che erano in grado di riprodurre papillomi della cute.

E' quindi ampiamente accertato che BPV-2 è il papillomavirus più frequentemente coinvolto nelle neoplasie vescicali (*Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003 e 2007; Lioi et al., 2004; Balcos et al., 2008; Borzacchiello e Roperto, 2008; Roperto et al., 2008*). BPV-1 e BPV-2 codificano tre oncoproteine, E5, E6 ed E7 sebbene la E5 sembra essere la proteina attualmente più studiata in quanto

un'alta percentuale di neoplasie vescicali del bovino esprime tale proteina (*Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003; Wosiacki et al., 2005, 2006; Roperto et al., 2008*).

In un recente studio, Somvanshi (2011) ha isolato il papilloma virus tipo I e tipo II anche in bufali naturalmente affetti da intossicazione da felce aquilina.

Lo stesso autore in un altro lavoro ha correlato la presenza di BPV-2 e di lesioni non-neoplastiche a carico della mucosa vescicale in un gruppo di 236 animali comprendente 94 bovini e 142 bufali. In particolare è stata evidenziata la presenza di lesioni infiammatorie sia acute che croniche in entrambe le specie; nel bufalo sono state isolate forme di cistite follicolare e di iperplasia nodulare, non riscontrate nei bovini.

Nel 2012, Pathania ha invece isolato mediante real-time PCR il Dna del virus BPV-2 sia nelle urine che nelle lesioni della mucosa vescicale di bovini affetti da Ematuria Enzootica in aree naturalmente infestate da felce aquilina.

Lo studio ha evidenziato inoltre una ridotta carica virale nei campioni esaminanti e una similarità nel Dna dell'agente isolato sia nelle forme infiammatorie che neoplastiche.

Un successivo lavoro di ricerca ha sfruttato la conoscenza del

comportamento molecolare del papilloma virus per la formulazione di un vaccino costituito da una forma inattivata di *binary ethylenimine* e *saponized cutaneous papilloma virus-2*.

Il vaccino è stato utilizzato in bovini affetti da EEC e ha determinato una riduzione del volume dei tumori vescicali di questi soggetti.

Chiaramente il lavoro rappresenta uno studio pilota e necessita di ulteriori approfondimenti per poter validare il trattamento terapeutico.

## **2.1 BVP2\_E5**

L'E5 è una piccola proteina idrofobica transmembranaria di tipo II costituita da 44 aminoacidi che risulta essere espressa nei primi stadi dell'infezione sia a livello del citoplasma delle cellule profonde dell'epitelio (*Anderson et al., 1997; Burnett et al., 1992; Chang et al., 2001; Venuti et al., 2002*) che in quelle degli strati basali e soprabasali dell'epitelio trasformato (*Borzacchiello et al., 2003*). In vitro, è stato dimostrato che, grazie alla sua natura idrofobica, E5 si localizza a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico (RE), e a livello dell'apparato del Golgi (AG) (*Burkhardt et al., 1989*;

*Pennie et al., 1993*). L'E5 interagisce con la subunità c della proteina ductina 16k, una componente di gap junction della pompa vacuolare H<sup>+</sup>-ATPase alterandone la sua funzione acidificante del lume dei compartimenti intracellulari (*Goldstein et al., 1991*).

Nel 2011, il gruppo di ricerca di Corteggio e collaboratori ha validato l'associazione tra l'attività oncogena del papilloma virus tipo I/II e la oncoproteina E5.

Gli autori hanno verificato l'alterazione nell'espressione della proteina Connexin 43, presente a livello delle Gap-junctions, nei soggetti affetti da varie forme di carcinoma della vescica.

Successivamente nel 2013 Cota condusse uno studio di immunoistochimica su 37 animali affetti da EEC associata a tumori della vescica.

Nello studio è stata valutata l'espressione delle proteine CK7, UPIII, D1 e p53 ed è stata verificata una elevata immunoreattività della proteina p53 nei carcinomi di stadio e grado elevato, confermando l'alta malignità dei tumori vescicali associati alla patologia.

### **3 Esame clinico e diagnostica di laboratorio**

#### **3.1 *Sintomatologia clinica e decorso***

Come già accennato in premessa, a seconda della quantità assunta attraverso l'alimentazione ed in funzione del tempo di esposizione ed ingestione di tale pianta, la felce aquilina è responsabile, nei bovini, di una sindrome emorragica acuta o di una forma ad andamento cronico.

La sindrome emorragica acuta è stata descritta in bovini che vengono alimentati con grandi quantità di felce per un periodo di tempo da 1 a 3 mesi e si caratterizza per diatesi emorragica, anomalie della coagulazione, grave soppressione midollare e/o associata a fenomeni di setticemia acuta (*Humphreys, 1988; Osweiler et al., 1986*). Gli animali si presentano disidratati, con secchezza delle mucose, occhi infossati e spenti, depressione del sensorio, astenia, febbre elevata (40,5° e 42 °C), stomatite e diarrea.

Frequenti sono i rilievi di una grave diatesi emorragica che si esprimono con epistassi, emorragie e/o soffiusioni episclerali, sottocutanee, enteriche e delle mucose esplorabili (*Humphreys, 1988*); in taluni casi si può assistere altresì alla comparsa di edema localizzati a livello di giogaia e collo con eventuale interessamento

laringeo responsabile di una sindrome dispnoica.

L'Ematuria Enzootica colpisce di solito bovini adulti di età superiore ai 3 anni, sebbene la sua massima incidenza si osserva intorno ai 7-9 anni di età.

Gli animali colpiti sono bovini utilizzati in alpeggio, o in genere liberi di pascolare in zone ricche di *Pteridium aquilinum*. La malattia non ha carattere stagionale sebbene le forme acute sono più frequenti in tarda primavera in concomitanza della presenza di germogli teneri particolarmente appetibili; fenomeni di riacutizzazione sono presenti durante il periodo primavera-estate. Le razze colpite sono essenzialmente podoliche.

Di Particolare rilevanza clinica è la presenza di altri animali allevati nelle stesse aree interessate e che mostrano sindromi legate all'ingestione di tale vegetale, quali la deficienza di tiamina in cavalli e suini (*Somogyi, 1971; Evans, 1976*), le neoplasie del canale gastrointestinale nei ruminanti (*Evans, 1968; McKenzie, 1978; Smith et al., 1988*) ed, infine, la degenerazione della retina nella pecora ('bright blindness').

La felce aquilina contiene infatti anche fattori anti-tiamina, in particolare una *tiaminasi di tipo 1* in grado di separare la molecola di tiamina nelle sue due strutture ad anello. Al contrario dei ruminanti, i



quali sono in grado di sintetizzare la tiamina, gli animali monogastrici richiedono la somministrazione esogena di tale aminoacido risultando particolarmente suscettibili all'azione delle tiaminasi presenti nella dieta. I sintomi clinici dell'intossicazione sono essenzialmente di natura nervosa e sono legati a lesioni necrotiche bilaterali cerebrocorticali (*poliencefalomalacia dei monogastrici*) (Evans, 1976). Per quanto attiene la degenerazione della retina nella pecora ('bright blindness'), tale patologia è stata descritta nel lontano 1965 da Watson e collaboratori che osservarono una grave stenosi vasale e progressiva atrofia della retina, anomalie sperimentalmente riprodotte mediante somministrazione di estratti essiccati di felce.

Nei bovini con ematuria enzootica l'anamnesi patologica prossima e recente indica la presenza di macroematuria intermittente e di intensità variabile, proporzionale alla quantità di felce assunta che, in genere si palesa dopo un periodo prodromico asintomatico di alcuni mesi o anni (Hopkins, 1986). Infatti la malattia mostra periodi di remissione clinica con apparente guarigione dell'animale, nonostante la possibile presenza di microematuria.

Gli animali si presentano dimagriti fino a manifestare, nelle fasi avanzate, un body condition score molto basso.

L'animale in genere può presentarsi meno reattivo, con calo delle produzioni e riduzione dell'appetito; le mucose si presentano secche, slavate e di colorito grigiastro o, nei casi più gravi, bianco perlaceo indicativo di un diverso grado di anemia; la cute è anaelastica con pelo irto ed opaco e, nei casi più gravi, imbrattata di sangue a livello vulvare e/o prepuziale; talvolta è possibile osservare la presenza di edemi sottocutanei localizzati nelle parti declivi (arti, giogaia e collo). Può inoltre essere presente tachipnea e tachisfigmia proporzionale alla gravità dell'anemia. Nei casi in cui sia presente uno stato febbrile, esso va in genere imputato alla presenza di una concomitante pielonefrite e/o cistite; in tal caso è inoltre presente un grave depressione del sensorio unitamente ad atteggiamenti di falsa cifosi causati dalla eventuale algia della regione lombare; non infrequente è inoltre il rilievo di stranguria e pollachiuria con presenza di micro-macroematuria. Nei casi più lievi soltanto la parte di urina emessa alla fine della minzione si presenta di un colorito rosato o rosso scuro, mentre nei casi inveterati l'urina emessa si presenta torbida e di colorito ematico con la presenza, talvolta, di veri e propri coaguli.

L'esplorazione rettale, nei casi a decorso acuto, può risultare negativa mentre nelle forme croniche è possibile palpare una parete

vescicale ispessita di consistenza aumentata e talvolta dolente (cistite). Particolare attenzione deve essere posta alla palpazione di entrambi i reni per escludere una eventuale presenza di pielonefriti o idronefrosi, quest'ultima legata alla presenza di masse tumorali in prossimità del trigono vescicale, con conseguente occlusione ureterale.

### **3.2 *Esami di laboratorio***

Negli allevamenti ubicati nelle aree esposte alla presenza di felce è necessario effettuare l'analisi completa delle urine in modo sistematico non escludendo, gli animali in cui non è presente una evidente ematuria; l'esame microscopico del sedimento eseguito dopo opportuna centrifugazione permette negli animali malati la visualizzazione di emazie, la cui concentrazione può variare fino a concentrazioni di 250 x  $\mu$ L.

Di Loria e collaboratori nel 2012 hanno verificato la presenza di ematuria con urine torbide di colorito marrone-rosso e odore ematico, nella maggioranza dei soggetti esaminati. Le urine degli animali malati presentavano, inoltre un peso specifico medio di 1024 e un pH alcalino compreso tra 8 e 9.

L'esame emocitometrico rileva la presenza di una anemia normocromica normocitica inizialmente rigenerativa, per poi divenire ipo-arigenerativa; nei casi inveterati è possibile osservare altresì forme di anemia ipocromica e/o leucopenia ed, infine, trombocitopenia; non infrequente è in oltre la presenza di una moderata eosinofilia.

Nei bovini colpiti può essere di aiuto, anche ai fini della diagnosi differenziale e della prognosi, effettuare un profilo ematobiochimico comprendente la funzionalità epato-renale (azotemia, creatininemia, glicemia, enzimi epatospecifici, assetto lipidico, quadro proteico elettroforetico), nonché specifiche indagini parassitologiche, sierologiche ed emocoagulative (PT, APTT e fibrinogeno). Nei soggetti affetti è possibile rilevare una lieve ipoprotinemia e ipoalbuminemia rispetto agli animali sani.

L'analisi del profilo coagulativo, in bovini affetti da ematuria enzootica, ha evidenziato PT (tempo di protrombina) e APTT (tempo di tromboplastina parziale attivata) normali mentre, i livelli plasmatici di fibrinogeno, proteina S e proteina C reattiva, risultano aumentati in relazione al processo infiammatorio cronico che viene a instaurarsi (*Di Loria et al ,2012*).

#### **4 Diagnostica per immagini delle basse vie urinarie del bovino:**

Le indagini strumentali collaterali sono di elevata importanza nella diagnosi delle patologie delle vie urinarie del bovino; in particolare l'ecografia e l'endoscopia rappresentano due *tecniche di imaging* indispensabili per poter fornire al medico veterinario un rilievo diagnostico adeguato, nonché un quadro prognostico e terapeutico chiaro; esse inoltre risultano fondamentali negli animali paucisintomatici e con sintomi acuti (*Franz, 2004*).

##### ***4.1 Cenni di anatomia della regione pelvica***

La cavità pelvica è delimitata dal “*bacino osseo*” formato dal sacro, dalle prime vertebre coccigee e dal osso pelvico che si incontrano ventralmente nella sinfisi pelvica.

*L'anello osseo* è circoscritto e ricoperto dai muscoli dell'anca e della groppa, che si estendono sulla superficie dorsale e laterale della pelvi.

La porzione distale della pelvi è delimitata ventralmente dall'arcata ischiatica, mentre il limite dorsale differisce nelle diverse

specie.

All'interno del cavo pelvico è possibile riscontrare l'ano, il retto, e parte della vescica.

Nelle femmine inoltre possiamo riconoscere il corpo dell'utero, la cervice e la vagina; nel maschio la porzione pelvica dell'uretra, i deferenti e le ghiandole accessorie del glande.

La porzione craniale della pelvi è rivestita da peritoneo e quindi tutti gli organi che vi sono alloggiati sono ricoperti da tessuto peritoneale.

In questa, la vescica è mantenuta in situ da due legamenti laterali e un legamento centrale (medianum) che contiene vestigi dell'uraco; mentre l'utero e le ovaie sono sospese nella cavità mediante i legamenti uterini (ligamentum latum uteri).

Nelle porzioni extraperitoneali della cavità pelvica, il peritoneo si invagina formando delle deflessioni che prendono il nome di sfondati pelvico-peritoneale (pelvic peritoneal pouches). Tra questi ricordiamo il pubo-vescicale, vescico-genitale e retto-genitale.

La deflessione pubo-vescicale è divisa in due parti dal legamento medianum della vescica, mentre nel maschio vi è una comunicazione tra sfondati vescico-genitale e retto-genitale.

La porzione terminale della pelvi non è rivestita da peritoneo e

quindi viene definita retro peritoneale ed è chiusa ventralmente dal perineo.

Quest'ultimo è delimitato anteriormente dal diaframma pelvico, che è attraversato dall'ano e dal canale urogenitale, e posteriormente da diversi muscoli; tra questi ricordiamo: muscolo dello sfintere anale esterno, muscolo dello sfintere uretrale, muscoli coccigei e elevatori dell'ano ( *Klaus, 2003*).

#### ***4.1.1 Vescica Urinaria***

Come già accennato, la vescica urinaria è un organo muscolo-membranoso impari che poggia sul pavimento del bacino. Nel bovino presenta forma quasi cilindroide, e si estende cranialmente al pube mentre, repleta è quasi totalmente addominale.

È, come noto, un serbatoio per l'urina che espelle al momento della minzione mediante contrazioni ritmiche.

E' quasi impossibile valutarne l'esatta capacità fisiologica poichè normalmente l'urina viene escreta quando la vescica raggiunge solo un terzo della sua capacità di ritenzione; uno studio su cadavere ha evidenziato che la capacità massima raggiunge i seguenti valori nelle

diverse specie: 2-3 L nel cavallo, 3-4L nel Bovino, 100-120 ml nel cane di media taglia.

Anatomicamente, nella vescica si distinguono le parti craniale o fondo, che termina in avanti con l'apice, media o corpo, e caudale o collo, che si continua con l'uretra.

Vuota e contratta la vescica presenta superficie raggrinzita e consistente al tatto; inoltre appare poco voluminosa e allungata caudalmente.

Nel bovino l'apice è acuminato poiché le vestigia dell'uraco formano una punta ispessita; mentre posteriormente al collo l'estremità caudale si restringe bruscamente.

La cavità della vescica è rivestita da una mucosa pallida, biancorosata o grigiastra, e fornita di pieghe irregolari che scompaiono con la replezione.

Nei soggetti vecchi talora assume aspetto reticolato poiché viene sollevata da fasci ipertrofici della muscolatura.

Al limitare della regione del fondo, sulla faccia dorsale abbiamo gli osti ureterici, mentre medialmente possiamo apprezzare l'ostio interno dell'uretra; questi tre orifizi delimitano una struttura particolare, il trigono vescicale, che nel bovino si presenta più stretto e corto rispetto alle altre specie.



Esso inoltre presenta struttura diversa rispetto alle regioni vicine in quanto il connettivo sottomucoso è scarso, mentre la mucosa appare più sottile e priva di pieghe.

La parete vescicale mostra caratteristiche differenti a seconda della condizione: è molto più sottile nello stato di replezione che in quello di vacuità, e quindi il suo spessore può variare da 2-3 mm a 1 cm e più. Risulta costituita da tre tonache: sierosa, muscolare e mucosa.

La sierosa nei Ruminanti riveste quasi la totalità dell'organo, non giunge fino al fondo come nelle specie ad ubicazione addominale della vescica, e si presenta più lassa per agevolare i movimenti di espansione e retrazione.

La tonaca muscolare risulta in cellule lisce, organizzate in fasci disposti in tre strati di cui il superficiale e il profondo longitudinali, mentre il medio circolare.

Nella regione dell'apice i tre strati sono più o meno fusi e assumono orientamento spiroide.

La tonaca mucosa è pallida e giallo-rosata. E' totalmente sprovvista di ghiandole, tranne che nel trigono.

La vescica è tenuta in situ dalla continuità con l'uretra e da alcuni legamenti.

Il legamento vescicale medio va dall'apice della vescica alla cicatrice ombelicale.

I legamenti vescicali laterali, che originano dalle pareti laterali del bacino e si portano ai lati della vescica, accogliendo le vestigia dell'arteria ombelicale.

Legamento vescicale ventrale o legamento pubo-vescicale che connette il corpo e il fondo con la sinfisi pubica.

Nel bovino il legamento mediano è breve, mentre i legamenti laterali si estendono fino a poca distanza dall'apice e si presentano più ampi che negli equidi.

Nella parte retroperitoneale è vincolata all'uretra e mediante connettivo infiltrato di grasso agli organi circostanti.

I rapporti della vescica variano a seconda del suo stato di riempimento:

nel maschio ha rapporti con le pliche urogenitali, la parte terminale dei deferenti, le vescichette seminali, la prostata e il retto dorsalmente; in questo punto il peritoneo passando dalla vescica al retto delimita lo sfondato vescicoretale.

Nella femmina la vescica stabilisce dorsalmente contatti con utero e vagina; mentre il peritoneo passando dalla vescica all'utero forma lo sfondato vescicouterino.

I vasi e i nervi hanno diversa provenienza. Le arterie originano principalmente nel maschio dall'arteria prostatica, nella femmina dall'arteria vaginale.

In entrambi i sessi rami accessori possono provenire dalle pudende e dalle ombelicali.

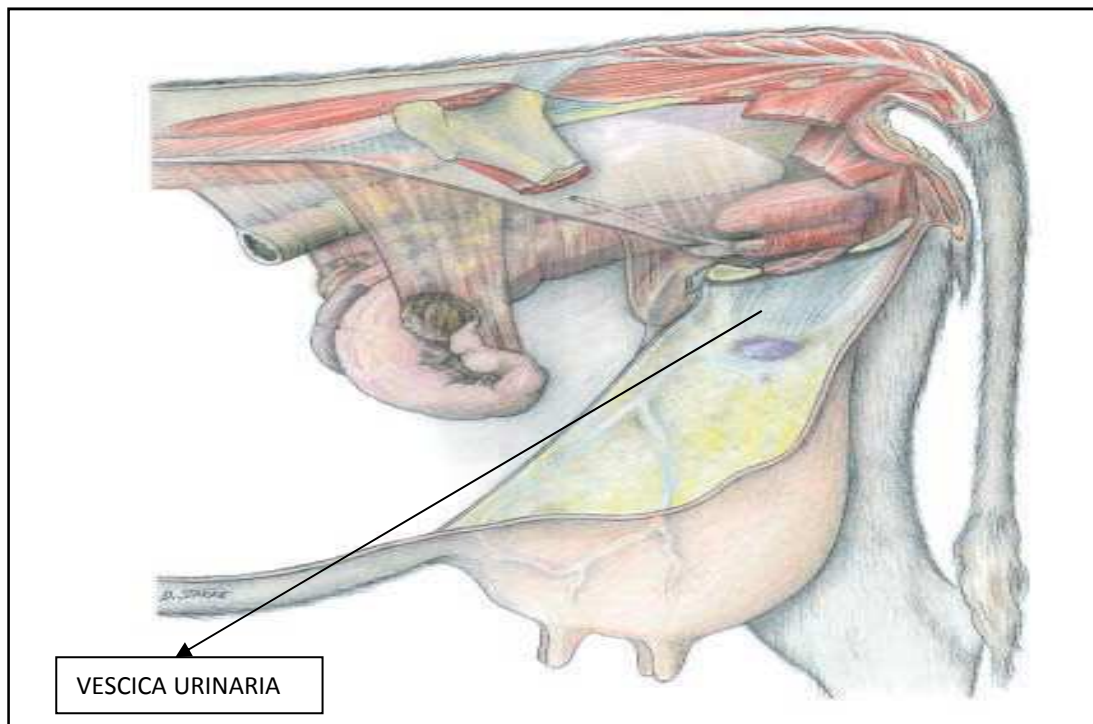
I vasi arteriosi formano una ricca rete perivescicale che irroro la parete dell'organo e confluisce in una rete sottomucosa.

Le vene costituiscono un plesso perivescicale connesso a quello vescico prostatico nel maschio e uretrovaginale nella femmina.

I linfatici formano come vene e arterie una rete che si raccoglie in un plesso, il quale parte dalla tonaca muscolare raccogliendosi nel plesso perivescicale dove emergono i collettori per i linfonodi iliaci.

I nervi derivano dal plesso pelvico (simpatico) e dalle branche ventrali dei nervi sacrali (parasimpatico); essi si distribuiscono sulla superficie dell'organo formando una rete lassa dalla quale derivano dei rami che si distribuiscono alla tonaca muscolare.

I nervi parasimpatici aumentano il tono della muscolatura mentre quelli simpatici lo abbassano (*Pelagalli, 1999*) (Fig.8).



**Fig.8:** Organi pelvici dopo rimozione dell'arto pelvico sinistro, della metà sinistra del bacino e della parete dell'addome.

#### **4.1.2 Uretra**

L'uretra è un condotto muscolo-membranoso che forma il tratto terminale delle vie urinarie per mezzo del quale l'urina viene espulsa dalla vescica verso l'esterno; nel maschio è anche utilizzata per il trasporto dello sperma durante l'eiaculazione.

Ha lunghezza e caratteristiche diverse nei due sessi. Nel toro presenta calibro piuttosto ridotto soprattutto in prossimità del meato uretrale esterno, nella femmina è lunga circa 10-12 cm e presenta

pareti distensibili che permettono l'utilizzo di sonde per tecniche diagnostico-terapeutiche (*Pelagalli, 1999*).

#### ***4.1.3 L'uretra nel maschio:***

Nel maschio l'uretra inizia dal collo della vescica con il meato uretrale interno, procede caudalmente sul pavimento della pelvi, percorre tutto il pene fino a terminare nell'estremità libera di quest'organo.

Data la sua lunghezza si può distinguere nella porzione pelvica e peniena.

La porzione pelvica è il tratto collocato sul pavimento del bacino ed ha rapporti dorsalmente con retto e prostata, ventralmente con i muscoli otturatori interni.

Per buona parte è avvolta dal muscolo uretrale, e termina sulla superficie del glande col meato uretrale esterno.

Sulla volta della porzione pelvica, caudalmente al meato uretrale interno, si solleva il collicolo seminale, rilievo ovoidale al cui apice si può trovare l'apertura dell'utero mascolino, vestigio del dotto di Muller.

A ciascun lato di questo si aprono i condotti eiaculatori derivanti

dalla confluenza del dotto deferente e della vescichetta seminale, ancora più lateralmente si aprono i dotti prostatici.

Nel toro il collicolo seminale è alto e stretto, accogliendo lo sbocco del dotto deferente e della vescichetta seminale, mentre manca l'utero mascolino.

Nel maschio, l'uretra è irrorata dalle arterie prostatica, pudenda interna e dorsale del pene.

Le vene formano un plesso sottomucoso e sboccano nei plessi pudendo, vescicoprostatico e nelle vene profonde del pene.

I linfatici sono tributari dei linfonodi iliaci e degli inguinali; mentre l'innervazione deriva da branche dei nervi pudendo, e dal plesso prostatico e cavernoso del pene(*Pelagalli, 1999*).

#### ***4.1.4 L'Uretra nella femmina:***

Nella femmina l'uretra è breve e posta sul pavimento del bacino. Essa prolunga caudalmente il collo della vescica e prende rapporti dorsalmente con la vagina.

Il suo tratto caudale è ricoperto ventralmente e lateralmente dal muscolo uretrale.

Si apre all'esterno con l'ostio uretrale esterno che nel bovino

appare come fessura trasversale, che sbocca nella parete del vestibolo della vagina. (Fig.9)

Nel bovino ad 1/2 cm dall'ostio esterno la parete ventrale dell'uretra mostra il diverticolo sub-uretrale, depressione profonda 2-3cm che occorre evitare quando si effettua cateterismo vescicale.

La parete dell'uretra femminile è costituita da una tonaca muscolare e una mucosa.

La muscolare presenta uno strato longitudinale esterno e uno circolare profondo, che non è altro che l'espansione dello sfintere vescicale.

La mucosa è relativamente ispessita e pallida, e presenta sulla faccia dorsale la cresta uretrale.

La sua tonaca propria è ricca di fibre elastiche; è fornita di numerosi vasi, i più grossi dei quali danno luogo, fra la mucosa propriamente detta e la muscolare, ad uno strato cavernoso, che diventa più spesso man mano che ci si avvicina all'ostio esterno.

La vascolarizzazione dell'uretra nella femmina è dovuta a rami dell'arteria vaginale e vescicale caudale; le vene sono tributarie dei plessi pudendo e vescicovaginale.

I linfatici si portano ai linfonodi ipogastrici, iliaci esterni e inguinali.

L'innervazione è operata da branche del nervo pudendo, del plesso ipogastrico e uretrovaginale.

La struttura dell'uretra si presenta simile in entrambi i sessi , e permette di distinguere una tunica mucosa, sottomucosa, muscolare e avventizia.

La tunica mucosa è costituita nei ruminati da epitelio di transizione che diviene stratificato in prossimità del meato uretrale esterno.

La sottomucosa presenta discreto sviluppo e accoglie un ricco plesso venoso, mentre la tunica avventizia si presenta costituita principalmente da tessuto connettivo.

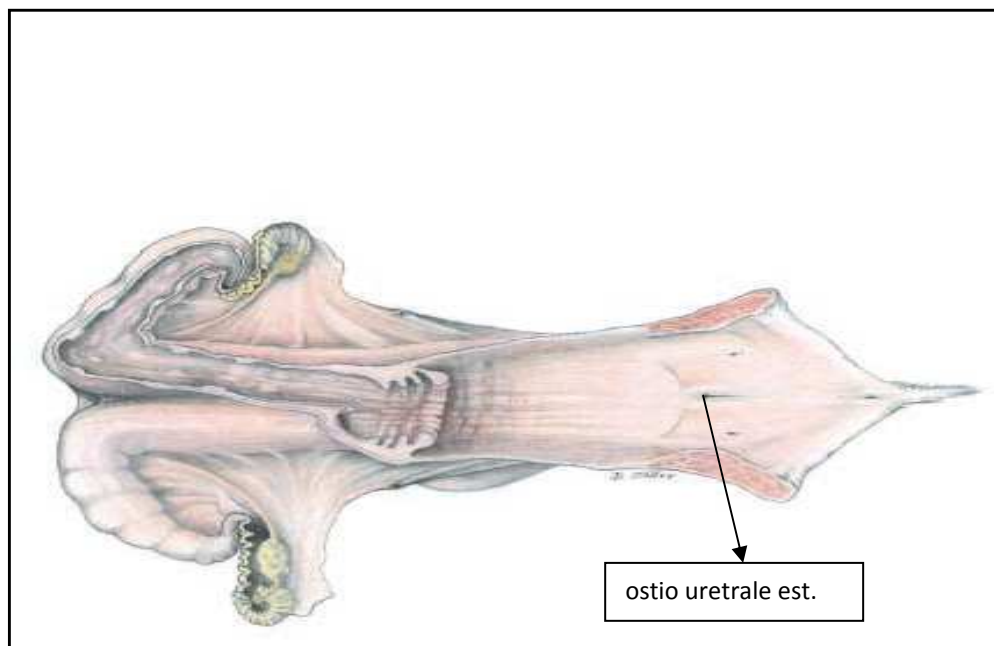
Tutta l'uretra, ad eccezione di un breve tratto prossimale e della zona distale, è avvolta da una lamina di tessuto muscolare striato che forma i muscoli uretrale e bulbo cavernoso.

A differenza del maschio nella femmina la tunica muscolare striata è in parte fusa con quella della vagina.

Nel maschio, Il muscolo uretrale, composto da fibre longitudinali e trasversali interessa l'uretra pelvica, e le ghiandole bulbo uretrali, partecipando all'espulsione dell'urina, nella femmina, ricopre il tratto caudale del condotto e il suo diverticolo, svolgendo le stesse funzioni del maschio.



Questo muscolo è ben sviluppato in questa specie e si presenta dorsalmente sostituito da una spessa lamina fibrosa che si continua latero-ventralmente con una sottile aponeurosi. (Pelagalli, 1999).



**Fig 9.-** Apparato genitale femminile e veduta del meato uretrale esterno.

## ***4.2 L'esame ecografico delle vie urinarie del bovino***

L'esame ecografico delle vie urinarie del bovino è un'indagine collaterale di notevole importanza, come ausilio dell'esame fisico diretto e degli esami di laboratorio.

Le patologie a carico dell'apparato urinario presentano una minore incidenza rispetto alle alterazioni gastroenteriche e della sfera riproduttiva; per tale motivo esse sfuggono al riconoscimento immediato da parte del clinico e di conseguenza possono essere sottostimate o addirittura trascurate (*Floeck, 2009*).

La semplicità di esecuzione e il costo contenuto delle apparecchiature fanno dell'ecografia una delle tecniche principe per lo studio dell'apparato urinario in tali ruminanti.

L'esame ecografico può essere eseguito per via transcutanea nei soggetti molto piccoli (vitelli, puledri), mentre è richiesto l'approccio transrettale per gli adulti (*Floeck-2009*).

La vescica, come già accennato in precedenza, si trova nella regione pelvica ma può estendersi in posizione intraddominale se piena e distesa; è un organo cavo che diventa facilmente visualizzabile quando repleto del suo contrasto naturale,

rappresentato dall'urina; inoltre il ballottamento della stessa permette di visualizzare materiale libero come calcoli o frustoli di fibrina, che posso creare anche artefatti.

Per la scansione transcutanea è necessario, come per le altre specie, eseguire la tricotomia del pelo e la disinfezione della cute.

Le sonde utilizzate per lo studio della vescica possono essere lineari o convex, con frequenza di 5.0 MHz; in vitelli molto piccoli è possibile utilizzare sonde di frequenza più elevata per ottenere una migliore risoluzione.

Per la visualizzazione dell'uretra si utilizzano sonde lineari di frequenza tra 10/15 MHz, ponendosi sulla linea mediana tra scroto e orifizio del prepuzio(*Floeck-2009*).

Lo studio ecografico degli ureteri è sempre indicato quando all'esplorazione rettale si avverte una sovradistensione degli stessi.

Dal punto di vista ecografico la rottura degli ureteri è un evento di difficile visualizzazione; è però sempre possibile riconoscere segni ecografici indiretti come l'accumulo di urina nello spazio retroperitoneale o il coinvolgimento dei reni con alterazione dell'ecostruttura degli stessi.

Per eseguire un corretto esame transrettale nel bovino adulto sono necessari un adeguato contenimento fisico dell'animale, pulizia del

retto dal materiale fecale e un buon riempimento della vescica. Le sonde vengono generalmente protette con involucri di silicone o plastica, e adeguatamente lubrificate.

In sede di esame vengono eseguite scansioni longitudinali e trasversali volte a visualizzare il fondo, il corpo e il collo della vescica (Fig.10- Fig.11), il trigono vescicale, il jet ureterale, le caratteristiche anatomiche dell'uretra e degli ureteri, nonché i rapporti anatomo-topografici con gli organi vicini.

Di rilevanza è anche la misurazione dello spessore della parete vescicale che varia con il grado di riempimento della stessa (*Nyland and Mattoon, 1995; Hoque, 2001*).

La vescica appare come una struttura ovoidale leggermente allungata con parete liscia ed ecogena. Generalmente si presenta repleta da urina che appare come un liquido anecogeno o ipoecogeno. La sua mucosa e muscolare possono essere visualizzate come strutture separate mediante l'utilizzo di sonde ad elevata frequenza. Molto spesso la visualizzazione dell'organo può essere disturbata dal gas presente nel grosso intestino.

L'uretra invece appare come una piccola struttura rotondeggiante con parete liscia ed ecogena, le cui pareti possono distendersi e collabire al passaggio dell'urina; il lume uretrale appare anecogeno.



**Fig.10:** Scansione ecografica trasversale di una vescica di bovino sano.



**Fig.11:** Scansione ecografica longitudinale di una vescica di bovino sano.

Normalmente gli ureteri non sono visualizzabili all'ecografia bidimensionale a meno che non vi siano processi patologici in atto(*Braun-1993*).

L'esame ecografico delle vie urinarie è sempre indicato in presenza di segni clinici legati ad una alterata minzione.

Lo studio ecografico di vescica e uretra deve essere sempre completato con l'esame dei reni al fine di escludere processi patologici anche a carico di questi ultimi, quali pielonefriti e idronefrosi (*Floek-2009*).

Le condizioni patologiche che si riscontrano con maggior frequenza sono le calcolosi uretrali e vescicali.

Le prime possono associarsi a minzione difficoltosa caratterizzata da stranguria e pollachiuria, blocco totale della minzione in caso di ostruzione uretrale completa, ritenzione di urina e atteggiamenti antalgici (calci all'addome, movimenti frequenti della coda e degli arti, irrequietezza, ripetuti tentativi di minzione); nei casi estremi l'abnorme distensione della vescica può condurre a rottura della stessa.

I calcoli vescicali sono invece associati a segni clinici di cistite, con minzione frequente.

Questi ultimi appaiono come strutture iperecogene generalmente di forma irregolare, che creano coni d'ombra posteriori; frequentemente sono multipli, di dimensione variabili e possono associarsi ad ispessimento della mucosa vescicale per un concomitante processo infiammatorio (cistite cronica).

I calcoli uretrali possono invece distribuirsi lungo tutta l'uretra, ma più frequentemente è possibile ritrovarli a livello della flessura sigmoidea e possono associarsi a uroperitoneo se la pressione generata dal blocco urinario è stata tale da causare rottura della vescica(*Radostits et al, 2007*).

La diagnosi di uroperitoneo viene effettuata constatando la presenza di liquido libero anaecogeno in addome che determina la fluttuazione degli organi addominali; la vescica appare vuota o con pareti collabite, oppure paucidistesa per la presenza di fibrina a livello della lesione, che riduce la fuoriuscita dell'urina; il prelievo mediante paracentesi del liquido presente in addome conferma il sospetto ecografico di uroperitoneo (*Reef VB,1998*).

Nei soggetti giovani è possibile evidenziare difetti congeniti come l'uraco pervio, atresia uretrale, ipoplasia o displasia renale(*Radostits, 2007*).

Nei processi infiammatori vescicali è possibile osservare

ispessimento focale o diffuso della parete.

Il contenuto della vescica può presentarsi anaecogeno con presenza di echi mobili di piccole dimensioni compatibili con coaguli sanguigni o fibrina, mentre le raccolte notevoli di sangue o pus danno origine ad aree di sedimento iperecogeno a livello della zona cranio-ventrale del viscere. Nelle forme croniche si possono inoltre rilevare aspetti di tipo proliferativo, circoscritti o diffusi, con margini irregolari fino a simulare forme vegetanti pseudo-neoplastiche (Floeck, 2009). Negli animali affetti da neoplasie vescicali è possibile rilevare la presenza di lesioni a carattere vegetante, oppure infiltranti o miste. Le lesioni vegetanti papillari superficiali si presentano come neoformazioni ecogene che protrudono nel lume vescicale, sprovviste di cono d'ombra, in cui la parete vescicale a livello della base di impianto del peduncolo, si presenta come una linea iperecogena continua e regolare. Le forme sessili si distinguono per una larga base di impianto mentre il peduncolo vascolare può essere, nei casi più eclatanti, identificato mediante l'impiego del color-doppler. Le forme infiltranti determinano un'alterazione dell'ecostruttura della parete con interruzione della linea iperecogena e, quindi, scomparsa della netta demarcazione tra lesione e parete.



### **4.3 Cistoscopia**

L'endoscopia (dal greco *endon*, "interno" e *σκοπή skopê*, "osservazione") permette di visualizzare gli organi “dall'interno” con modalità “true-to-life”.

Questa costituisce un mezzo diagnostico ausiliare ormai validato in tutte le specie; è infatti una tecnica di uso routinario nell'uomo e negli animali d'affezione, mentre è meno utilizzata negli animali da reddito, dove trova applicazione soprattutto per la diagnosi di patologia a carico dell'apparato riproduttore, locomotore e urinario.

Le prime indicazioni dell'uso dell'endoscopia nel bovino risalgono a Liess nel 1936, il quale fornì linee guida per l'applicazione di questa tecnica, e in particolare per l'utilizzo della cistoscopia.

Precedentemente Smith (1925) aveva condotto uno studio sulla diagnosi endoscopica dei tumori e delle lesioni da tubercolosi degli ureteri del bovino.

Molto più tardi, Wallace et al. (1990) e Hejný (1995) hanno stabilito che l'indicazione più importante per l'uso della cistoscopia nel bovino fosse la diagnosi di cistite, polipi e neoplasia della vescica urinaria, in quanto a differenza dell'ecografia permetteva una

visualizzazione diretta della mucosa vescicale.

Per poter mettere in atto la tecnica ci si può avvalere dell'uso di endoscopi rigidi o flessibili; in letteratura è descritto l'uso di endoscopi rigidi generalmente di 40 cm di lunghezza e 4mm di diametro con fibra ottica di 70° per la visualizzazione delle basse vie urinarie (*Hejný, 1995*).

Per eseguire la cistoscopia è necessario il contenimento fisico dell'animale che può essere supportato da quello farmacologico se non sufficiente; è inoltre necessaria la disinfezione dell'area urogenitale, e per la vescica è possibile, ai fini dell'esecuzione di prelievi biotici o per meglio visualizzare la mucosa, eseguire lavaggi con soluzioni disinfettanti e antibiotate.

Franz e collaboratori (2004) hanno validato l'affidabilità della tecnica endoscopica nelle patologie vescicali del bovino come ausilio dell'esame fisico, delle indagini di laboratorio e dell'esame delle urine.

Lo studio è stato eseguito su 23 vacche di razza diversa, con sospetto anamnestico di patologia dell'apparato urinario.

I soggetti sono stati sottoposti ad esame fisico, analisi delle urine, esami ematologici e biochimici, nonché esame endoscopico.

Gli autori hanno correlato le caratteristiche fisiche delle urine

all'aspetto della mucosa vescicale osservata endoscopicamente, inoltre hanno confermato il quadro endoscopico osservato attraverso la valutazione post-mortem della mucosa vescicale.

La vescica urinaria delle bovine sane mostra superficie liscia e scintillante, il colore varia da bianco a giallo, con trama vascolare poco accentuata; a seconda del grado di replezione è possibile visualizzare un numero variabile di pieghe (*Franz, 2004*).

Se la superficie è priva di alterazioni è possibile visualizzare mediante endoscopia anche gli ureteri, che appaiono come sbocchi di calibro ridotto sulla superficie dorsale dell'organo in una area definita ureterales columnae. A livello dello sbocco degli ureteri è possibile osservare urina di colore giallo-chiara fuoriuscire da essi.

Nei processi infiammatori e neoplastici la mucosa vescicale appare alterata al pari delle urine prodotte.

Infatti nelle cistiti catarrali la mucosa è di un colore rosa pallido, con aumento del calibro e del numero di vasi sulla superficie, che non appare più liscia ma opaca e vellutata per l'edema sottostante; inoltre l'urina che ne deriva si presenta giallo torbida senza coaguli o fibrina, ed essendo un processo catarrale è possibile visualizzare filamenti di muco (*Franz, 2004*).

Le cistiti emorragiche sono invece caratterizzate da colorito rosso

della mucosa, che si presenta anche in questo caso opaca, ma i vasi assumo calibro ancora maggiore formando una rete indistinta sulla superficie dell'organo; è possibile riconoscere coaguli e filamenti di fibrina. L'urina si presenta rosso torbida con coaguli di sangue (*Franz, 2004*).

Nelle cistiti fibrinoso-purulente la mucosa appare opaca e di aspetto bozzellato, si notano accumuli di fibrina e frustoli di pus, il colore può variare dal giallo all'arancio. L'urina in questa condizione patologica è di colore giallo carico, torbida con filamenti di fibrina.

In alcuni processi patologici è possibile individuare forme miste fibrino-emorragiche in cui l'aspetto delle cistiti fibrinoso-purulente si associa a imponente emorragia (*Franz-2004*).

L'urina è di colore rossastro per presenza di sangue, ma sono evidenti anche filamenti di fibrina.

In corso di ematuria enzootica cronica la mucosa dell'organo appare ispessita, ripiegata su se stessa, di colorito giallastro, e con trama vascolare accentuata; si osservano comunemente focolai emorragici di varie dimensioni soprattutto a livello del trigono vescicale o delle pareti, accompagnanti da lesioni a placca o a "cavolfiore" protese verso il lume vescicale. Infine nel lume dell'organo è di facile rilievo la presenza di coaguli talvolta di grandi

dimensioni fino ad una piccola noce.

Generalmente in campo possono essere effettuati prelievi biotici, provenienti da fondo, collo e trigono vescicale che posti in formalina e/o azoto liquido, possono essere utilizzati per eseguire indagini istopatologiche, immunoistochimiche e di diagnostica molecolare.

La tecnica cistoscopica ha inoltre il vantaggio di poter essere impiegata per scopi terapeutici diretti come ad esempio l'asportazione di calcoli dalla vescica o uretra, la resezione di neoplasie, lavaggi disinfettanti e antibiotati.

## 5 Reperti istologici e quadro necroscopico

Negli animali affetti da EEC l'esame post-mortem della carcassa rivela la presenza di un pallore diffuso associato ad un ispessimento della parete vescicale con focolai emorragici puntiformi o circoscritti, di colore rosso o nerastro e/o ulcerata. L'esame del lume evidenzia la presenza di proliferazioni pisiformi o peduncolate le cui dimensioni e localizzazioni variano ampiamente, localizzati in diverse aree della mucosa vescicale arrivando talvolta anche a colpire l'intera superficie.(Fig.12)



**Fig12:** Sezione necroscopica di una vescica di bovino affetto da EEC: la mucosa appare ispessita ed irregolare, Sono evidenti fenomeni iperemici ed emorragici.

Nei casi senza complicazioni gli altri distretti dell'apparato urinario appaiono apparentemente integri, sebbene talvolta è possibile anche a livello di ureteri e nella pelvi renale riscontrare analoghe forme proliferative. L'esame istologico mette in evidenza una ipervascolarizzazione, emorragie intramurali e soprattutto, neoplasie di diversa istogenesi, sia mesenchimale che epiteliale, quali papillomi, neoplasie papillari a basso grado di malignità (PUNLMP), carcinoma in situ, emangioma, emangiosarcoma, talvolta anche tra loro associati. Non infrequente è l'osservazione di metastasi a livello dei linfonodi iliaci o ai polmoni a partenza soprattutto da tumori epiteliali maligni (*Jubb KVF, Kennedy PV, Palmer N, 1993*).

I pattern istologici dei tumori uroteliali sono stati classificati in accordo alla classificazione morfologica dei tumori uroteliali umani del 2004 della World Health Organization (WHO)(*Epstein et al., 2004; Lopez-Beltran et al., 2004; Lopez-Beltran e Montironi 2004; Reuter 2004; Fine et al., 2005 Montironi e Lopez- Beltran 2005*)(Tab.2).

Sulla base dei pattern morfologici di crescita di tali neoplasie uroteliali e di lesioni uroteliali che vengono considerate simil-neoplastiche, sono state identificate quattro categorie istologiche: lesioni piatte, lesioni di aspetto esofitico o papillare, lesioni endofitiche.

Le lesioni piatte comprendono l'iperplasia uroteliale, l'atipia reattiva, la displasia uroteliale ed il carcinoma *in situ*.

L'iperplasia uroteliale consiste in un ispessimento marcato dell'urotelio senza che però siano presenti caratteristiche citologiche di atipie; in medicina umana esistono opinioni discordanti riguardo la potenziale evoluzione maligna di tale lesione, anche se è importante notare che nel bovino sono state descritte alterazioni genetiche a livello di epitelio iperplastico sia adiacente a neoplasie che adiacente ad urotelio normale (*Crawford, 2008; Majewski et al., 2008; Mitra e Cote, 2009*).

L'atipia reattiva è una lesione che ricorre generalmente in presenza di infiammazione acuta o cronica o coesiste insieme a displasia o a carcinoma *in situ* (CIS).

La displasia uroteliale mostra caratteristiche citologiche che possono essere interpretate come preneoplastiche e spesso è presente in concomitanza di neoplasie uroteliali, ma può occasionalmente presentarsi anche in assenza di neoplasie.

Il carcinoma *in situ* (neoplasia intrauroteliale di alto grado) è una neoplasia piatta caratterizzata da cellule con evidenti caratteristiche citologiche di malignità.

Le lesioni uroteliali esofitiche (papillari), comprendono l'iperplasia uroteliale papillare, il papilloma, le neoplasie uroteliali a basso



potenziale di malignità (PUNLMP) ed i carcinomi uroteliali papillari a basso e ad alto grado di malignità. L'iperplasia uroteliale papillare è caratterizzata da urotelio di aspetto ondulato organizzato in pliche strette di altezza varia; tale lesione può presentarsi isolata o associata a tumori papillari.

Nell'uomo sono state riportate alterazioni genetiche , suggerendo che tale lesione potrebbe costituire un precursore di neoplasia uroteliale (*Chow et al., 2000*).

Il papilloma è una neoplasia costituita da un delicato asse fibrovascolare ricoperto da urotelio indistinguibile dall'urotelio normale sia nella polarità che negli strati di cellule; si presentano raramente isolati e più spesso sono presenti insieme a neoplasie maligne. La neoplasia uroteliale a basso potenziale di malignità (PUNLMP) è un tumore uroteliale papillare somigliante ad un papilloma uroteliale esofitico, ma è caratterizzato da una aumentata proliferazione cellulare che supera il normale spessore dell'urotelio normale.

Il carcinoma uroteliale papillare di basso grado di malignità è caratterizzato da fronde papillari di urotelio apparentemente ordinato, ma tali tumori mostrano disordine architettonico ed atipia nucleare facilmente riconoscibili.

Il carcinoma papillare di alto grado di malignità è caratterizzato da fronde papillari uroteliali aventi crescita disordinata e da moderata fino a marcata atipia citologica e morfologica.

Le lesioni uroteliali con aspetto endofitico comprendono il papilloma uroteliale a crescita di tipo 'invertito', ed il carcinoma uroteliale con pattern di crescita invertito.

Il carcinoma uroteliale invasivo è una neoplasia uroteliale che invade la membrana basale; sono presenti nidi, clusters o singole cellule a livello della lamina propria o, meno frequentemente, nella muscolaris mucosae. La maggior parte di questi tumori sono di alto grado di malignità, ma i carcinomi invasivi risultano essere meno comuni delle neoplasie papillari.

Diverse varianti istologiche di carcinoma infiltrante sono state osservate nel bovino, in particolare, carcinoma uroteliali contenenti foci di metaplasia squamosa o ghiandolare, carcinoma con fisionomia a nidi, microcistica, micropapillare ed infine il carcinoma variante sarcomatoide.

Le neoplasie mesenchimali sono di origine prevalentemente endoteliale. L'esame istologico permette di classificarli in due categorie: gli emangiomi, gli emangiosarcomi e gli emangioendoteliomi, tumori intermedi tra emangiomi ed emangiosarcomi.

Inoltre, nel 2012 Pires et al hanno riscontrato la presenza di un emangiosarcoma epiteloide, una neoplasia maligna vascolare, nella vescica di 4 bovini affetti da Ematuria Enzootica.

**Tab. 2** - Classificazione morfologica dei tumori uroteliali bovini in accordo con la classificazione morfologica dei tumori uroteliali umani 2004, World Health Organization (WHO), Roperto et al. 2009).

<p><b>Lesioni uroteliali piatte non invasive (assenza di atipia cellulare)</b></p>	<p><b>Lesioni uroteliali piatte non invasive (presenza di atipia cellulare)</b></p>
<p>Iperplasia piatta</p>	<p>Atipia reattiva</p> <p>Atipia di significato sconosciuto</p> <p>Displasia (basso grado di neoplasia intrauroteliale)</p> <p>Carcinoma <i>in situ</i> (alto grado di neoplasia intrauroteliale)</p>
<p><b>Lesioni esofitiche (papillari) uroteliali</b></p>	<p><b>Lesioni uroteliali endofitiche</b></p>
<p>Iperplasia papillare</p> <p>Papilloma</p> <p>PULNMP (lesione uroteliale a basso potenziale malignità)</p> <p>Carcinoma papillare a basso grado di malignità</p> <p>Carcinoma papillare ad alto grado di malignità</p>	<p>Papilloma uroteliale invertito</p> <p>Neoplasie uroteliali a pattern di crescita invertito</p>
<p><b>Neoplasie uroteliali invasive</b></p>	<p><b>Varianti istologiche di carcinoma uroteliale</b></p>
<p>Carcinoma uroteliale invasivo a basso grado</p> <p>Carcinoma uroteliale invasivo ad alto grado</p>	<p>Carcinoma uroteliale con metaplasia squamosa</p> <p>Carcinoma uroteliale con metaplasia ghiandolare</p> <p>Carcinoma uroteliale variante nested</p> <p>Carcinoma uroteliale variante sarcomatoide</p> <p>Carcinoma uroteliale variante microcistica</p> <p>Carcinoma uroteliale variante micropapillare</p>
<p><b>Lesioni proliferative benigne di tipo ghiandolare</b></p>	
<p>Cistite ghiandolare</p> <p>Cistite cistica</p> <p>Nidi di von Brunn</p>	

## **6 Emostasi e funzione endoteliale in animali affetti da EEC.**

Il sistema emostatico viene oggi rappresentato come un insieme di attività collegate atte a preservare l'integrità della circolazione sanguigna. In circostanze normali l'emostasi è regolata in modo tale da promuovere la fluidità del sangue; inoltre, è capace di indurre la coagulazione del sangue nelle sedi di danno vascolare, al fine di arrestare la fuoriuscita del flusso ematico dal letto vasale ogni volta che l'integrità dei vasi è danneggiata. I principali componenti del sistema emostatico comprendono la parete vasale, le proteine plasmatiche (fattori della coagulazione e i fattori fibrinolitici) e la componente cellulare ematica, rappresentata principalmente dalle piastrine.

Tali componenti svolgono la loro azione in modo collettivo, interagendo e costituendo così il sistema regolatore dell'emostasi.

La parete vasale è costituita da un monostrato di cellule endoteliali che delimitano la superficie dell'intero albero circolatorio, rappresentando l'unico tipo cellulare con cui le emazie entrano in contatto in condizioni normali. Nell'uomo la superficie endoteliale di un soggetto adulto è composta da circa  $1-6 \times 10^{13}$  cellule, che pesano approssimativamente 1 Kg e che potrebbero coprire una superficie equivalente a circa sei campi da tennis (*Cines et al., 1998; Henderson, 1991*).

Fino a qualche decennio fa, le cellule endoteliali erano considerate semplicemente delle barriere per il flusso ematico, agendo solamente con un meccanismo passivo, come se dovessero solo rivestire ed impermeabilizzare il letto vascolare. Le moderne ricerche in tale campo ci permettono oggi di considerare l'endotelio come un organo dinamico con complesse capacità metaboliche, quali il controllo della permeabilità vascolare, il trasporto ai tessuti di sostanze nutrienti e di molecole biologicamente attive, la mediazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice all'interno della parete vasale, la mediazione delle interazioni tra le cellule ematiche, la mediazione della risposta infiammatoria e dell'angiogenesi.

L'endotelio è anche un regolatore dell'emostasi (*Wu e Thiagarajan, 1996; Schafer, 1997*), essendo esso provvisto di un ampio repertorio di attività, le quali ne permettono la trasformazione da potente superficie antitrombotica a protrombotica. Tali fenomeni non si verificano in maniera uniforme; difatti in tutto l'albero circolatorio, e persino nell'ambito di un singolo organo, vi è una marcata eterogeneità nell'espressione fenotipica delle cellule endoteliali (*Risau, 1995*).

Questa eterogeneità sembra essere determinata sia da fattori genetici che ambientali. Solitamente la conversione in senso emostatico della parete vasale è scatenata da un danno meccanico e dall'attivazione delle

cellule endoteliali da parte di citochine, endotossine, forze emodinamiche e stimoli ipossici. Si tratta quindi di un sistema in cui vige un equilibrio tra forze protrombotiche e forze antitrombotiche, che rientra nel concetto di bilancia emostatica endoteliale. Diversi meccanismi antitrombotici fisiologici agiscono di concerto per prevenire la coagulazione in condizioni normali. L'attività ottimale di ciascuno dei sistemi anticoagulanti dipende dall'integrità dell'endotelio vascolare. Molti fattori prodotti dall'endotelio, quali l'antitrombina, il sistema proteina C/proteina S/trombomodulina e l'inibitore della via del fattore tissutale (TFPI), agiscono in diversi punti della cascata della coagulazione per ridurre l'accumulo di fibrina sulla superficie endoteliale. La fibrina che si genera nonostante queste difese anticoagulanti, viene poi degradata dal sistema fibrinolitico. La trombomodulina (TM) è un proteoglicano di membrana ad azione anticoagulante, presente sulla superficie di tutte le cellule dell'endotelio vasale (*Bourin et al., 1990*). Questa molecola possiede una elevata affinità nei confronti della trombina ed è proprio attraverso la formazione del complesso TM-trombina che tale fattore endoteliale esplica la propria attività anticoagulante (*Esmon et al., 1981*). Infatti, la formazione del suddetto complesso attiva la proteina C, la quale in presenza della proteina S inibisce i fattori V e VIII, appartenenti

rispettivamente alla via comune ed intrinseca della coagulazione. La TM accelera inoltre il processo di neutralizzazione della trombina da parte dell'ATIII (azione eparin-like) e interagisce con il fattore IV (calcio), essenziale nel processo della coagulazione. La trombina fissata sulla trombomodulina è incapace di attivare altri fattori come il fibrinogeno, sul quale la trombina stessa svolge un'attività proteolitica, determinandone la trasformazione in fibrina. Questo proteoglicano è costituito da tre porzioni: una piccola porzione intracitoplasmatica implicata in meccanismi di endocitosi, una catena corta intramembranaria idrofoba e una catena lunga extramembranaria, costituita da sostanze quali il condroitin-solfato, responsabile dell'azione eparin-like, essenziale per l'azione antitrombotica della trombomodulina (*Esmon et al., 1995*).

E' infatti a livello di questa porzione che avviene l'interazione con le varie molecole, quali la trombina, il fattore piastrinico IV della coagulazione, alcune proteine specifiche dei granulociti eosinofili. Queste proteine dei granulociti eosinofili inibiscono l'azione della trombomodulina, e tale rilievo spiegherebbe come in corso di sindromi ipereosinofiliche si possano manifestare dei fenomeni trombotici (*Slungaard et al., 1993*). La TM viene espressa anche dalle cellule di tumori maligni linfovaskolari, di carcinomi squamocellulari esofagei,



carcinomi epatocellulari, polmonari, e può essere utilizzata come marker ai fini della diagnosi differenziale fra diversi tipi di tumori (*Appleton et al., 1996*). Si è visto inoltre che una diminuzione della produzione di trombomodulina da parte di queste cellule, si associa molto spesso alla presenza di metastasi. Infatti, le cellule tumorali che si distaccano, migrano attraverso i vasi sanguigni e riescono ad aderire in un altro sito grazie alla formazione di ponti di fibrina. La trombomodulina attraverso la sua azione anticoagulante impedirebbe la formazione di questi ponti e limiterebbe l'invasione metastatica delle cellule tumorali (*Suehiro et al., 1995*).

La proteina C è una glicoproteina plasmatica sintetizzata dal fegato, composta da una catena leggera ed una pesante. E' uno zimogeno di serino-proteasi, la cui sintesi è vitamina K-dipendente. Per svolgere la sua azione inibitoria la proteina C deve essere attivata dalla trombina, attraverso il clivaggio di un ponte Arg 169-Leu 170 nella sua catena pesante (*Esmon, 1993*). L'attivazione trombino-indotta si verifica fisiologicamente sulla trombomodulina, (*Sadler, 1997*). La TM rappresenta il recettore della trombina: quando la trombina si lega a tale recettore, essa modifica la sua affinità di substrato (normalmente rappresentato dal fibrinogeno, fattore XIII, fattore VIII, fattore V) ed attiva la proteina C, innescando la via della anti-coagulazione controllata

da tale serino-proteasi. La trombina da sola è in grado di attivare la proteina C, ma tale attivazione si verifica 20.000 volte più velocemente se mediata dalla TM. La TM deve quindi il suo nome alla capacità di modulare l'attività della trombina da pro ad anti-coagulante. La trombomodulina esercita, quindi, una funzione antitrombotica, sia legando la trombina, e quindi rimuovendola dal circolo, sia promuovendo la produzione della proteina C attivata. Il legame della trombina con la trombomodulina determina un cambiamento conformazionale della trombina stessa, tale che l'enzima non è più in grado di svolgere la sua attività pro-coagulante. Questi cambiamenti molecolari, infatti, le fanno perdere la capacità di attivare i fattori V, VIII e XIII della coagulazione, di interagire con la superficie piastrinica, formando il complesso pro-trombinasico, e di trasformare il fibrinogeno in fibrina. In forma attivata la proteina C (APC) è una serino-proteasi che esercita le sue proprietà anticoagulanti clivando e quindi distruggendo i fattori V e VIII della coagulazione, ed ancora più rapidamente le loro forme attive (Va e VIIIa). Questa reazione è accelerata da un cofattore, la proteina S. Nel plasma la proteina S risulta veicolata da un carrier, la proteina CABP, e solo quando è libera da esso è in grado di svolgere la sua funzione di cofattore per la proteina APC. Analogamente alla proteina C, la proteina S è una glicoproteina che subisce una

carbossilazione post-traduzionale vitamina K-dipendente atta a formare residui di acido  $\gamma$ -carbossiglutammino (Gla), che le permettono di legarsi ai fosfolipidi di superficie carichi negativamente. La proteina S agisce come cofattore aumentando l'affinità della proteina C attivata per i fosfolipidi, con la formazione del complesso protein C-asi legato alla membrana. Deficit quantitativi o qualitativi della proteina C o della proteina S, o la resistenza all'azione della proteina C attivata, attraverso una mutazione specifica a livello della sede di clivaggio del fattore Va (fattore V di Leiden), portano ad uno stato ipercoagulabilità (*Esmon, 1993; Schafer, 1994*). Oltre a quest'azione anticoagulante la proteina C attivata possiede un'azione fibrinolitica, antiischemica e antinfiammatoria. Yasuo Yamaguchi e collaboratori (1997) hanno dimostrato infatti che la trombomodulina e la proteina C attivata inoculate in ratti, nei quali era stata indotta una ischemia epatica, riducono la concentrazione delle citochine ad azione chemiotattica sui granulociti neutrofili, che veicolano mediatori flogistici responsabili di danno endoteliale. L'azione anticoagulante della APC è altresì dovuta alla sua capacità di potenziare il sistema fibrinolitico. L'APC forma un complesso con l'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1).

Fisiologicamente l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), risulta essere un fattore primario endogeno in grado di attivare la fibrinolisi, convertendo il plasminogeno in plasmina. La APC, attraverso l'inattivazione del PAI, rende libera da controllo l'attività del tPA, che così tende ad amplificare la fibrinolisi.

Riduzioni delle concentrazioni plasmatiche di proteina C e S possono riscontrarsi a seguito di deficienze ereditarie o acquisite. Quest'ultime, legate anche ai ridotti livelli di TM e EPCR, sono comunemente correlate all'uso di anticoagulanti a scopo terapeutico (warfarin) o di stati coagulativi che intervengono nel corso di interventi chirurgici, CID e trombosi.

Altre condizioni patologiche quali diabete, sepsi, vasculiti e aterosclerosi, possono ancora influire limitandone la concentrazione plasmatica. Infine anche in patologie epatiche si può associare una riduzione di questi fattori, in quanto il fegato è deputato alla sintesi delle proteine vitamina K-dipendenti.

Tuttavia si possono riscontrare anche livelli plasmatici più alti di proteina C. Tale condizione sembra sia legata al rilascio del fattore piastrinico 4 nei siti oggetto di danno vasale; in tal modo una maggiore espressione della proteina C limiterebbe l'evento protrombotico.

Studi condotti recentemente hanno evidenziato un aumento della proteina S e C, nonché del fibrinogeno, nelle bovine affette da Ematuria Enzootica Cronica in assenza di alterazioni renali ed epatiche (Urraro, 2009; Di Loria et al, 2012).

La trombina svolge un ruolo fondamentale nel coordinare, integrare e regolare l'emostasi. A seconda delle circostanze, essa può promuovere o prevenire la coagulazione del sangue. Questo enzima catalizza le reazioni d'attivazione di diversi fattori della coagulazione che portano alla formazione della fibrina, all'attivazione del fattore XIII, promuovente i legami crociati della fibrina, e all'attivazione e all'aggregazione delle piastrine. A concentrazioni di trombina più basse e in presenza di endotelio intatto, predominano i suoi effetti antitrombotici. Bassi livelli di trombina stimolano l'aumento dei livelli della proteina C attivata, considerata un anticoagulante endogeno circolante (Hanson et al., 1993). In presenza di endotelio non danneggiato, la TM rimuove la trombina libera dal sangue, mentre le basse concentrazioni di trombina stimolano il rilascio dell'attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (t-PA), di NO e PGI<sub>2</sub> dalle cellule endoteliali.

L'ATIII è la principale proteasi inibitrice della trombina e degli altri fattori della via intrinseca e di quella comune della coagulazione. Essa è una glicoproteina a catena singola (alfa-globulina), del peso molecolare

di 58.000 Da, sintetizzata a livello epatico ed appartenente alla famiglia delle cosiddette serpine (**serine-protease inhibitors**) (*Van Boven e Lane, 1997; Lane e Bayston, 1997*).

L'antitrombina neutralizza la trombina e gli altri fattori della coagulazione attivati, attraverso la formazione di un complesso stechiometrico, equimolecolare ed irreversibile, tra il sito attivo dell'enzima della coagulazione ed il centro reattivo dell'antitrombina (Arg 393 e Ser 394).

L'interazione fra trombina e AT-III può avvenire spontaneamente, ma in presenza di eparina o di molecole eparino-simili, come le catene laterali di eparan-solfato dei proteoglicani delle cellule endoteliali, la velocità della reazione aumenta di oltre tre ordini di grandezza (1000-3000 volte). Le catene di eparan-solfato, oltre a catalizzare l'interazione tra AT-III e trombina, legano anche il TFPI (tissue factor pathway inhibitor), che inibisce la via estrinseca della coagulazione interagendo con il fattore Xa.

Pertanto, l'inattivazione da parte dell'antitrombina della trombina e degli altri fattori attivati della coagulazione, piuttosto che nel plasma, probabilmente, si verifica fisiologicamente sulle superfici vascolari, laddove è presente l'eparan-solfato che catalizza queste reazioni. Le molecole eparin-like interagiscono con le regioni ricche di aminoacidi

carichi positivamente dell'ATIII (siti lisinici). Questa interazione determina una modificazione allosterica dell'antitrombina, che viene resa più affine alla trombina: si forma un complesso stabile mediante il legame tra l'arginina dell'antitrombina e la serina del sito attivo della trombina. L'ATIII è in grado di inibire anche altri fattori della coagulazione, quali IX<sub>a</sub>, X<sub>a</sub>, XI<sub>a</sub>, XII<sub>a</sub>, callicreina e plasmina. In ordine di importanza, l'inibizione del fattore Xa viene subito dopo l'inibizione della trombina. Deficit ereditari, quantitativi o qualitativi dell'ATIII, portano quindi ad una predisposizione al tromboembolismo (*Schafer, 1994; De Stefano et al., 1996*). Il D-dimero è un prodotto di degradazione della fibrina stabilizzata da legami crociati covalenti. La sua presenza nel sangue dipende dall'attivazione della coagulazione con formazione di fibrina, sua stabilizzazione per azione del fattore XIII (attivato dalla trombina) e successiva proteolisi da parte del sistema fibrinolitico. Ha un peso molecolare di circa 180000 dalton e un'emivita in vivo di circa 4-6 ore. Il D-dimero è rilevabile in bassa concentrazione nel sangue di soggetti sani, il che indica l'esistenza di uno stato di equilibrio fra la formazione di fibrina e la sua lisi anche in condizioni fisiologiche. La concentrazione del D-dimero aumenta in tutte le circostanze, specifiche o aspecifiche, associate o caratterizzate da fibrino-formazione e fibrinolisi.

## **7 Cenni sul ruolo svolto dal sistema emocoagulativo nei processi neoplastici**

I disordini della coagulazione costituiscono una problematica molto comune nei pazienti affetti da neoplasie.

Come già accennato, l'associazione tra una condizione di ipercoagulazione e neoplasie maligne è stata riconosciuta, per la prima volta, nel 1865 dal Professor Trousseau il quale pose in evidenza l'alta incidenza di trombosi venose a carico degli arti in pazienti affetti da carcinoma gastrico (*Trousseau, 1872*). In seguito, diverse osservazioni cliniche e patologiche hanno confermato il rischio di tromboembolismo in pazienti affetti da cancro, sottolineando la presenza di una interazione tra cellule neoplastiche e sistemi della coagulazione e/o della fibrinolisi.

Carcinomi del tratto gastro-intestinale mucino-secernenti, carcinomi ovarici, pancreatici, della prostata, del polmone (*Bick, 1978; Rickles et al., 1983*), la leucemia promielocitica (*Goldeberg et al., 1987*) e tutti i disordini mieloproliferativi (*Schafer, 1987*) sono tra le neoplasie che risultano più frequentemente associate ad eventi tromboembolici.

La correlazione tra coagulazione e cancro viene supportata da studi istologici e dall'utilizzo di tecniche immunochimiche o di microscopia elettronica che permettono di dimostrare la presenza di fibrina all'interno e perifericamente a tumori primari e metastasi, come anche la presenza



di microtrombi piastrinici che risultano associati alla crescita delle cellule neoplastiche (*Edwards et al., 1981*).

Molteplici meccanismi, sia diretti che indiretti, sono implicati nella fisiopatologia dei disordini coagulativi che si verificano in pazienti affetti da neoplasia; le cellule neoplastiche sintetizzano diversi fattori favorenti la coagulazione del sangue e tra questi i fattori meglio definiti risultano essere il fattore tissutale (TF) ed il fattore tumorale della coagulazione (cancer procoagulant, CP).

TF è una glicoproteina transmembranaria che forma un complesso micromolecolare con il fattore VII, attivante la via estrinseca della coagulazione; TF sembra essere anche coinvolto in diversi stadi dello sviluppo metastatico, soprattutto nell'evento di neovascolarizzazione che caratterizza la disseminazione ematogena delle cellule neoplastiche (*Francis et al., 1998*).

CP è una cisteina proteinase che attiva direttamente il fattore X, indipendentemente dal fattore VII; essa è stata riscontrata principalmente nei tessuti neoplastici, ma anche nel tessuto fetale umano (*Donati et al., 1986*).

In corso di neoplasie umane, sono stati dimostrati altri fattori favorenti la coagulazione del sangue, quale un fattore ad attività simil-fattore XIII e capace di legami crociati covalenti della fibrina ed, inoltre,

un recettore del fattore V associato alla membrana delle cellule neoplastiche e che facilita “l'assemblaggio” del complesso protrombinasico della coagulazione (*Van de Water et al., 1985*).

La subunità A potenzialmente attiva del fattore XIII della coagulazione è stato identificato in differenti linee cellulari quali, megacariociti, piastrine e monociti/macrofagi e risulta essere presente occasionalmente anche in alcune cellule neoplastiche.

Le cellule neoplastiche sintetizzano anche fattori ad attività fibrinolitica; è ben noto che la maggior parte delle cellule neoplastiche possono esprimere sulla loro superficie tutte le proteine necessarie alla regolazione dei pathways fibrinolitici (*Falanga et al., 1999*). Sia l'attivatore tissutale del plasminogeno sia l'attivatore dell'u-plasminogeno (u-PA) che il suo inibitore (PAI-1), sono espressi in vari tipi di linee cellulari tumorali e tessuti neoplastici; l'espressione di u-PA sembra essere correlata con l'aggressività ed il grado istologico di alcuni tumori, come anche la progressione clinica di diversi carcinomi (*Lhindal et al., 1990*).

Tra i meccanismi diretti implicati nella fisiopatologia dei disordini coagulativi in corso di neoplasie, è stato considerato il rilascio di un numero di citochine proinfiammatorie. La produzione di fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ) ed interleuchina-1 (IL-1 $\beta$ ) può indurre

l'espressione di TF e PAI-1 e down-regolare l'espressione di trombomodulina da parte delle cellule endoteliali, risultando in una ridotta attivazione del sistema della proteina C, uno dei principali sistemi di difesa endogeni di inibizione della coagulazione (*Dittman et al., 1990*).

Anche le piastrine contribuiscono alla metastasi intensificando l'interazione tra la cellula neoplastica e la matrice extracellulare. Tra i mediatori coinvolti nell'interazione tra piastrine e cellule neoplastiche c'è un metabolita dell'acido arachidonico, l'acido 12(S)-idrossieicosatetraenoico, 12(S)-HETE (*Honn et al., 1992*).

L'isoforma della 12-lipossigenasi (12-LOX), l'enzima metabolizzante l'acido arachidonico a 12(S)-HETE risulta espresso in una varietà di tumori umani.

Recenti studi hanno dimostrato in stadi avanzati di cancro della prostata, un'overespressione di 12-LOX che stimola angiogenesi e crescita tumorale.

L'aggregazione piastrinica è un importante meccanismo nella genesi del trombo in molte patologie umane, compreso il cancro, e tali microtrombi piastrinici possono offrire alle cellule neoplastiche una protezione contro le difese dell'ospite, contribuendo, quindi, ad una ulteriore progressione della malattia (*Falanga et al., 1999*). Ugualmente, le cellule neoplastiche interagiscono con le cellule endoteliali attraverso

molecole di adesione di membrana e rilascio di citochine, determinando la potenziale adesione dell'endotelio e l'arresto di altre cellule, es. leucociti e piastrine.

Le membrane piastriniche contengono elevate concentrazioni di integrine che sono coinvolte nell'adesione piastrinica alla matrice extracellulare; l'alfaIIb beta3 integrina può specificamente indurre attivazione ed aggregazione piastrinica. Honn e collaboratori (1992) hanno dimostrato che questa integrina è espressa non solo a livello di piastrine ma anche a livello dell'adenocarcinoma prostatico dell'uomo ed inoltre, in una varietà di linee cellulari neoplastiche di differenti origini istologiche e diverse specie e può partecipare alla progressione metastatica.

## **PARTE SPERIMENTALE**

## **Materiali e metodi**

Nella presente tesi 230 bovini di razza podolica, provenienti da allevamenti condotti allo stato brado o semibrado ubicati in diverse aree del Sud Italia, notoriamente ricche di *Pteridium aquilinum*, sono stati sottoposti ad esame delle urine attraverso l'impiego di strisce reattive durante il periodo Marzo 2012 - Giugno 2014, al fine di svelare la presenza di ematuria.

Al termine della fase di screening sono state selezionate 24 bovine di età compresa tra i 5 e 12 anni, affette da Ematuria Enzootica Cronica, che sono state sottoposte ad esame obiettivo generale (EOG) e all'esame obiettivo particolare dell'apparato urinario. Su tutti gli animali selezionati, inoltre, sono stati eseguiti un esame completo delle urine, nonché indagini ematologiche ed ematobiochimiche di routine, con particolare riferimento alla funzionalità midollare, epatica e renale.

L'esame delle urine, come accennato in precedenza, è stato effettuato utilizzando strisce reattive commerciali (Combur test® Roche, Swiss) unitamente all'osservazione microscopica del sedimento, finalizzata a confermare la presenza di globuli rossi in corso di micro- e macroematuria, nonché ad escludere la presenza di uova di elminti (*Schistosoma bovis*).

L'esame emocromocitometrico è stato eseguito con l'ausilio di un contaglobuli ottico laser (ADVIA 120 Bayer - Germany) e successivamente sono stati allestiti strisci ematici, al fine di poter valutare la formula leucocitaria, la morfologia degli elementi globulari, la stima piastrinica, nonché escludere l'eventuale presenza di protozoi endocellulari.

Il siero ottenuto previa centrifugazione (2500 r.p.m. per 10 minuti) è stato stoccato a -20° C fino al momento dell'esecuzione dei seguenti esami ematobiochimici: azotemia, creatininemia, glicemia, creatinifosfochinasi (CPK), aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), fosfatasi alcalina (ALP), gamma glutamil transpeptidasi (GGT), bilirubina totale, colesterolo e quadro proteico elettroforetico. La titolazione sierica della creatinina e dell'urea è stata effettuata con metodo cinetico-colorimetrico, utilizzando kit commerciali della Spinreact (Reactivos Spinreact S.A. OLOT, Gerona, Spagna); kit della stessa ditta sono stati impiegati anche per la determinazione sierica degli enzimi sopraelencati. Si è proceduto infine ad eseguire indagini sierologiche e parassitologiche al fine di escludere le più comuni patologie a carattere infestivo ed infettivo protozoiario, presenti nelle aree geografiche interessate.

Inoltre si è eseguita la valutazione dell'emostasi primaria e secondaria. Oltre alla conta piastrinica, l'emostasi primaria è stata esplorata sottoponendo l'animale ad indagini collaterali dirette: la fragilità vasale (prova del pizzicotto) e il tempo di emorragia (stillicidio). L'emostasi secondaria è stata studiata su plasma ottenuto mediante centrifugazione a 1200 r.p.m. per 10 minuti dal sangue intero raccolto in provette contenenti sodio citrato al 3,8%. I campioni sono stati stoccati a -80° C, e quindi impiegati per la determinazione del tempo di protrombina (PT), del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) e del fibrinogeno, secondo quanto riportato in un precedente studio (*Di Loria et al., 2012*) utilizzando Kit commerciali Hemosil™ (instrumentation Laboratory Company- USA). Per i parametri analitici sono stati considerati i range di normalità per il bovino presenti in letteratura internazionale (*Weiss, 2010; Kaneko, 1997*).

Gli animali, adeguatamente contenuti, sono stati sottoposti ad esame ultrasonografico della vescica per via transrettale e successivamente ad esame cistoscopico.

L'esame ultrasonografico è stato eseguito impiegando un apparecchio portatile della ditta Esaote, modello "MyLab-30Gold", dotato di sonda microconvex multifrequenza (CA123 6.0 - 10 MHz) (Fig. 13). L'esame della vescica é stato condotto utilizzando scansioni eseguite secondo il piano longitudinale e trasversale dell'organo. L'esame è stato, inoltre, completato dalla valutazione dei linfonodi regionali (iliaci e lombo aortici) (Fig.14).



**Fig.13:** Apparecchio ecografico utilizzato per lo studio della vescica in bovine con EEC: "Mylab 30 Gold- Esaote"





**Fig.14:**Esecuzione di un esame ecografico vescicale per via trans rettale in bovine con EEC.

L'esame cistoscopio e' stato eseguito impiegando un endoscopio rigido (Karl Storz, Germany), costituito da un sistema ottico con angolatura di 30°, diametro di 4 mm, provvisto di camicia resettoscopica da 28 Ch e fonte di luce fredda Xenon 300 w 6000°K (Fig15).



**Fig.15:** Endoscopio rigido (Karl Storz, Germany), con sistema ottico e di registrazione, utilizzato per lo studio della vescica in bovine con EEC.

Al fine di favorire l'accesso in vescica è stato impiegato uno speculum vaginale, che permetteva una corretta visualizzazione della plica uretrale e, qualora necessario, il viscere è stato disteso attraverso l'introduzione di soluzione fisiologica attraverso il canale di servizio dello strumento. Successivamente le immagini cistoscopiche sono state visualizzate su un monitor e adeguatamente documentate in formato digitale mediante l'ausilio di telecamera integrata (MonoCCD - obiettivo 25mm Karl Storz - Germany). (Fig.16)



**Fig.16:** Esecuzione di un esame cistoscopio in bovine con EEC.

Durante l'esame sono stati eseguiti almeno tre campionamenti biotici della mucosa vescicale, prelevati dalle aree in cui erano presenti lesioni focali o, in loro assenza, rispettivamente dal trigono, dalla parete e dal pavimento del viscere. Le biopsie sono state ottenute impiegando una pinza da biopsia ad apertura bilaterale per sistemi di visione a 30° ed una pinza tipo Blakesley (5mm - 36/33 cm – rotante) (Fig.17).



**Fig17:** Pinza da biopsia ad apertura bilaterale per sistemi di visione a 30°.

I campioni ottenuti sono stati prontamente conservati in formalina al 10%; successivamente venivano inclusi in paraffina per ottenere sezioni dello spessore di 4µm ed infine sono stati colorati con ematossilina ed eosina (H&E). L'esame istopatologico di tutti i campioni ottenuti è stato effettuato presso il servizio di Diagnostica Oncologica, Isto-Cito-Patologica e di Necroscopia del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali di Napoli.

La diagnosi istopatologica é stata effettuata utilizzando la classificazione morfologica dei tumori uroteliali dell'uomo secondo quanto riportato dalla World Health Organization (WHO) (2004) e in accordo con quanto riportato in medicina veterinaria da Roperto e collaboratori (2010).

Per ogni animale é stato infine valutata la tolleranza nei confronti delle due tecniche diagnostiche, impiegando una scala del dolore utilizzata in medicina umana (*Park et al., 2004*) e modificata per la specie in esame, con punteggio progressivo da 0 a 10 (Tab. 3).

<b>SCALA DEL DOLORE</b>	
<b>PUNTEGGIO</b>	<b>SEGNI CLINICI</b>
<i>1</i>	Assente
<i>2</i>	animale irrequieto
<i>3</i>	tachisfigmia, tachipnea e minzione
<i>4</i>	dilatazione pupille
<i>5</i>	fasi di deglutizione ed apnea
<i>6</i>	sporadiche emissioni vocali durante l'esame
<i>7</i>	frequenti emissioni vocali durante l'esame
<i>8</i>	l'animale si sottrae durante alcune fasi dell'esame
<i>9</i>	dolore manifesto: l'animale si sottrae durante l'esame
<i>10</i>	dolore manifesto in assenza di stimoli

**Tab.3:** Scala di valutazione del dolore utilizzata.

## **Risultati**

I dati anamnestici mettevano in evidenza che 20 su 24 (83,3%) animali mostravano macroematuria intermittente da oltre due anni; l'esame fisico diretto ha messo in evidenza in tutti i soggetti esaminati un BCS compreso tra 1.5 e 2.5, associato ad ipotrofia della muscolatura appendicolare, maggiormente evidente in 7 animali con macroematuria (Fig.18).



**Fig. 18:** Bovino affetto da EEC: Evidente dimagrimento ed ipotrofia muscolare.

Nella maggior parte degli animali l'esame del sensorio risultava nelle norme, al pari di quello dei linfonodi e della temperatura. L'esame della cute evidenziava talora ipoelasticità con mantello opaco e secco, nonché

moderata disidratazione. La valutazione delle mucose esplorabili rivelava un colorito bianco-grigiastro in 20 animali e perlaceo nei rimanenti 4 soggetti. In tutti gli animali era presente una lieve tachipnea a riposo (28-35 arm) e una modica tachisfigmia (85-90 bpm). Per quanto riguarda le grandi funzioni organiche, in soli 2 animali è stato possibile osservare fenomeni di disuria/stranguria.

Diciotto animali mostravano all'esame clinico evidente ematuria, non rilevata nelle rimanenti 6 bovine, le quali presentavano solo microematuria, svelata all'esame del sedimento urinario; l'urina si presentava di un colorito rossastro, in alcuni casi associato alla presenza di micro- e macrocoaguli. L'esame macroscopico (Fig.19) delle stesse permetteva di evidenziare una macroematuria caratterizzata da aspetto torbido (Vogel VI), pH 7-8, odore ematico e colore rosso intenso legato alla presenza di globuli rossi (100-250/ $\mu$ l) evidenziati all'esame del sedimento unitamente a diversi leucociti; era inoltre possibile osservare proteinuria (0.3-5 gr/L), emoglobinuria, nonché cellule delle basse vie urinarie. Non erano presenti cilindri.



**Fig.19:** Bovino affetto da EEC: si noti l'evidente ematuria.

L'esplorazione rettale era nella maggior parte dei casi negativa e solo in 5 animali era possibile palpare un ispessimento più o meno circoscritto della parete vescicale, associato talora ad algia seguita da minzione spontanea.

In tutti gli animali era presente una anemia normocitica ipocromica, con carattere di maggiore gravità in 12 soggetti (50%). Gli animali mostravano infatti una riduzione di emoglobina e globuli rossi, con valori compresi rispettivamente tra 4,2-8,3 g/dL (range fisiologico: 8-15 g/dl) e  $2,24 - 4,6 \times 10^9/l$  (range fisiologico:  $5-10 \times 10^9/l$ ) (Jain, 1986), nonché dell'ematocrito. In 9 soggetti era presente trombocitopenia con valori compresi tra  $50-80 \times 10^9/l$  (range fisiologico  $100-800 \times 10^9/l$ ) mentre in 6 è stata rilevata leucopenia con valori limite di  $2800 \times 10^9/l$  (range  $4000-12000 \times 10^9/l$ ); infine 4 soggetti mostravano una moderata eosinofilia. Le analisi ematobiochimiche hanno messo in evidenza negli animali oggetto del presente studio la presenza di: ipoproteinemia nel 23% (5/24) con valori compresi fra i 4 e 5,4 g/dl , di questi due animali presentavano ipoalbuminemia con valori rispettivamente di 1,63 e 1,10 g/dl. Una lieve iperazotemia è risultata presente nel 43.7% (10/24), mentre un aumento della GGT della AST è stato riscontrato in due soli animali.

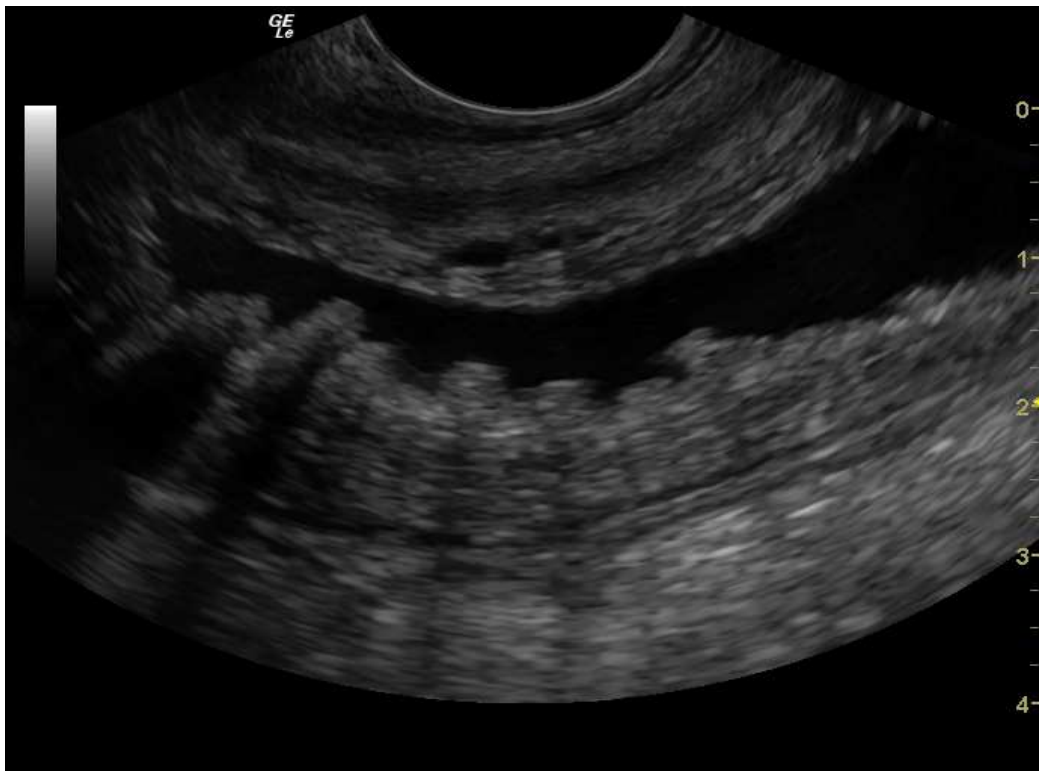
Per quanto attiene il profilo emocoagulativo, tutti gli animali hanno mostrato un incremento del fibrinogeno con valori medi  $3,553 \pm 1,110$  g/L (range 1,5-2,2 g/L).

L'esame ultrasonografico della vescica evidenziava in tutti gli animali la presenza di un ispessimento più o meno diffuso della parete, maggiormente evidente negli animali con macroematuria (valore medio di  $3,1 \pm 0,3$  cm); in questi ultimi, inoltre, la mucosa presentava un aspetto



polipoide (Fig.20), con il riscontro in 6 animali su 18 di strutture vegetanti a partenza dalla porzione medio-inferiore del viscere, con dimensioni variabili (valore medio di  $2,2 \pm 0,2$  cm), ecostruttura complessa, margini irregolari e fluttuanti nel lume del organo (Fig.21).

Infine, in sospensione erano presenti echi mobili multipli di media intensità, riferibili alla marcata componente cellulare ematica.

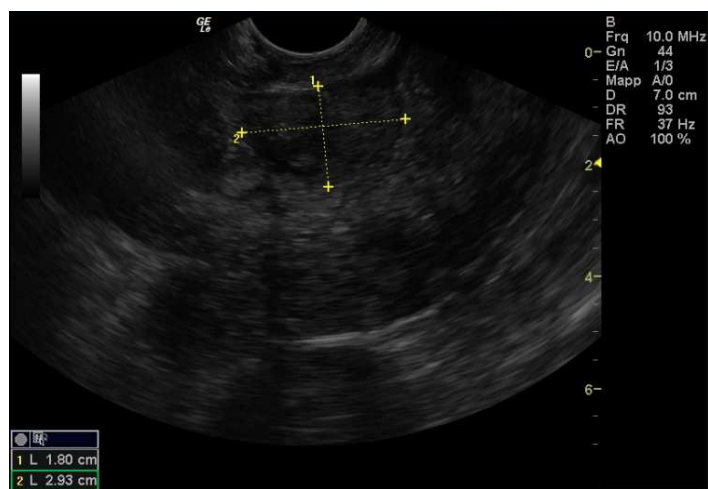


**Fig. 20:** Scansione longitudinale mediana della vescica di un bovino con EEC: si noti l'aspetto polipoide della mucosa vescicale.



**Fig. 21:** Scansione longitudinale mediana della vescica di un bovino con EEC: si noti l'ispessimento diffuso della parete vescicale e la presenza di una lesione di tipo vegetante.

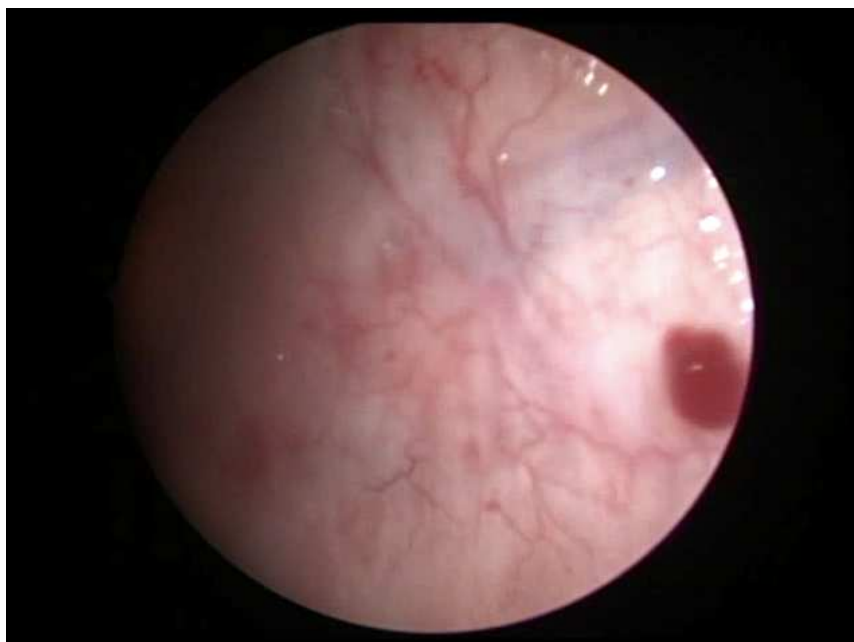
In due bovine con macroematuria (2/24; 8,3%) è stato possibile mettere in evidenza un aumento di volume a carico dei linfonodi iliaci, i quali presentavano margini irregolari ed ecostruttura disomogenea (Fig22).



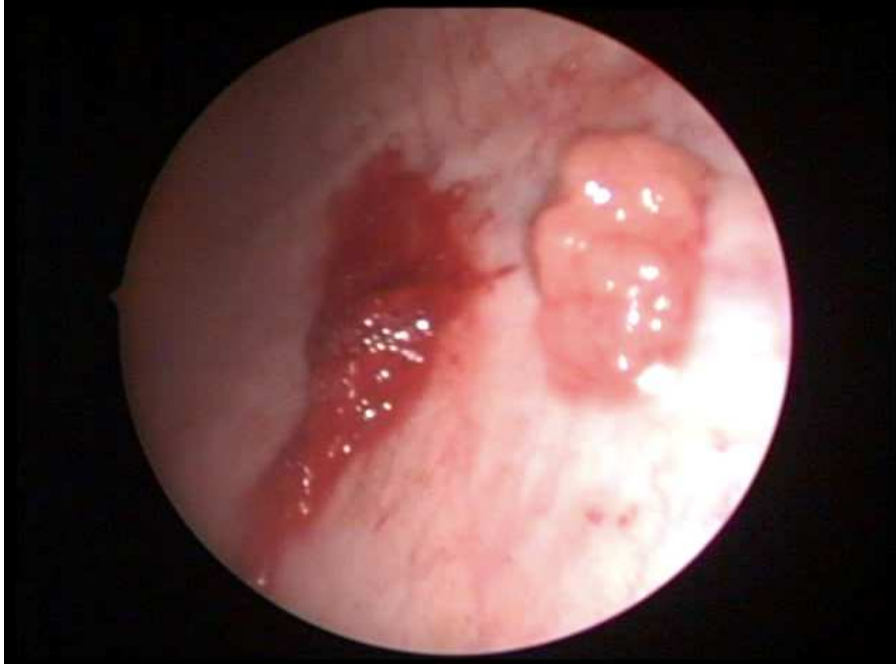
**Fig. 22:** Linfonodo iliaco in un bovino con EEC si noti l'aumento delle dimensioni, i margini irregolari e l'ecostruttura disomogenea.

All'esame cistoscopico la mucosa vescicale di tutti i soggetti esaminati si presentava edematosa, corrugata ed opaca, con colorito pallido e trama vascolare accentuata; erano inoltre presenti in 18 animali aree circoscritte proliferanti, piatte o bottoniformi, principalmente localizzate a livello della volta e delle pareti laterali dell'organo, di colorito nerastro e/o rossastro e delle dimensioni comprese tra 0,2 m e 1,4 cm. (Fig.23)

Lesioni proliferative di maggiori dimensioni, presenti in 6 animali, di colore variabile dal roseo al rosso scuro, di aspetto sessile o fungoide erano localizzate preferibilmente a livello del corpo della vescica, alcune delle quali presentavano anche lesioni ulcerative e/o villose con base di impianto più o meno ampia (Fig.24; Fig.25). In 23 animali erano inoltre presenti diffuse soffiusioni emorragiche e petecchie, associate nei soggetti con macroematuria alla presenza di fibrina e coaguli.



**Fig. 23:** Esame cistoscopico in un bovino con EEC: si noti l'accentuazione della trama vascolare e la presenza di una lesione bottoniforme rossastra.



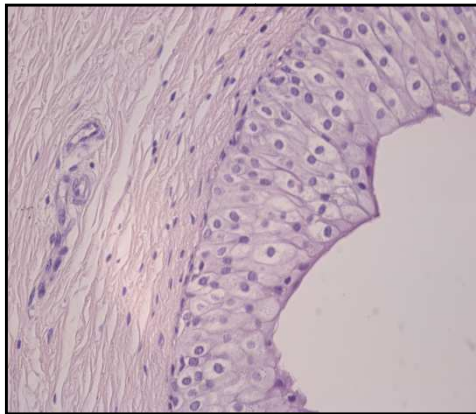
**Fig.24:** Esame cistoscopico in un bovino con EEC: sono evidente diverse lesioni di natura proliferativa.



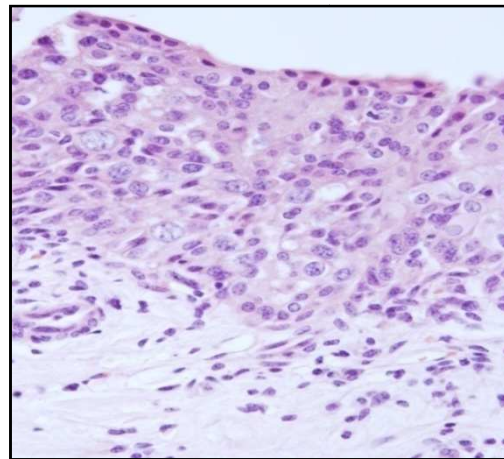
**Fig.25:** Visione all'esame cistoscopico di una lesione proliferativa con aspetto vegetante risultata localizzata a livello della volta della vescica con concomitante prelievo bioptico.

L'esame bioptico metteva in evidenza, in questi 24 animali, soprattutto carcinoma in situ (18/24), due displasie di cui una associata ad angioma(1/24) e l'altra a carcinoma infiltrante di basso grado di invasività (1/24), tre carcinomi endoluminali (3/24) e una forma sarcomatoide (1/24) (Tab. 4).(fig.26-27-28-29-30-31-32)

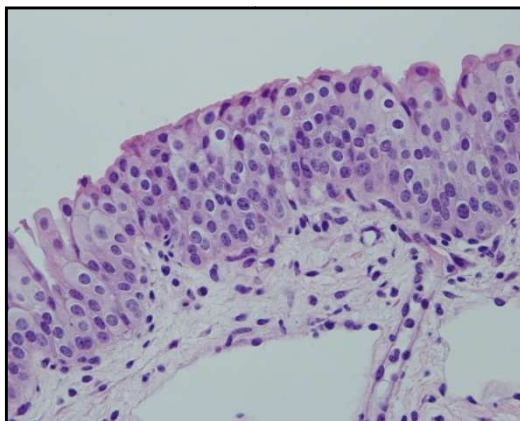
La valutazione della dolorabilità alle manovre diagnostiche ha permesso di registrare una migliore tollerabilità dell'esame ultrasonografico (score medio 2) rispetto all'esame cistoscopico (score medio 5).



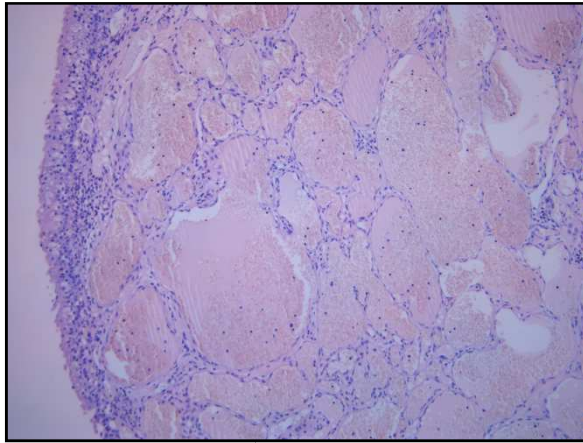
**Fig.26:**Urotelio normale;H&E,40X.



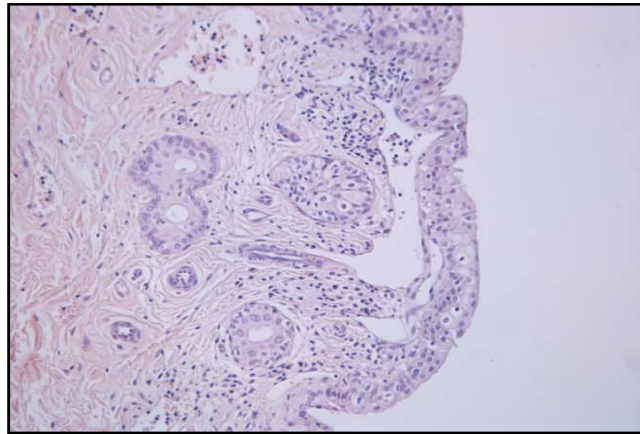
**Fig.27:** Carcinoma in situ;H&E,40X.



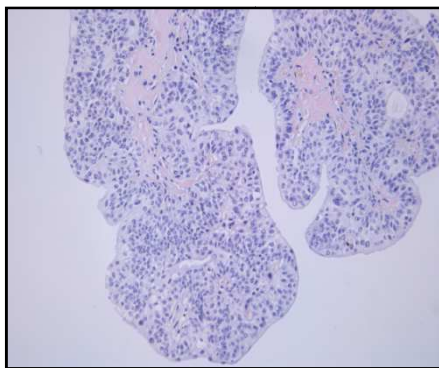
**Fig.28:** Displasia; H&E,20X.



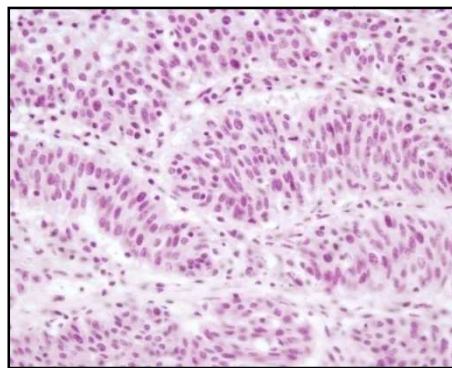
**Fig.29:** Angioma; H&E,10X.



**Fig.30:** Carcinoma infiltrante a basso grado di invasività- H&E,20X.



**Fig.31:** Carcinoma endoluminale;  
H&E,20X.



**Fig.32:** Carcinoma sarcomatoide;  
H&E,40X.

**Tab.4:** Risultati istologici dei prelievi bioptici in 24 bovine affetti da EEC.

<b>Tipo</b>	<b>Numero di campioni</b>
<b>Tumori epiteliali</b>	<b>23</b>
<i>Maligni</i>	22
CIS	18
- in associazione a Ca endopapillari AG	3
- in associazione a Ca endoluminale BG	3
- in associazione a tumori vascolari	8
- in associazione a neoplasie infiltranti	4
Carcinoma endoluminale	3
Carcinoma infiltrante b.g. invasività	1
Varianti istologiche Variante carcinoma sarcomatoide	1
<b>Tumori mesenchimali</b>	<b>1</b>
Tumori vascolari Angioma in associazione a displasia	1
<b>Numero totale di campioni</b>	<b>24</b>

## **Considerazioni e conclusioni**

I progressi scientifici e tecnologici ottenuti nel campo della diagnostica per immagini hanno di fatto migliorato notevolmente l'approccio metodologico allo studio delle patologie vescicali nei bovini affetti da ematuria.

In letteratura veterinaria sono presenti pochi studi ultrasonografici in corso di ematuria enzootica, Hoque e collaboratori(2002) hanno riscontrato nella maggioranza degli animali esaminati un significativo ispessimento della parete vescicale associato talvolta a forme vegetanti. Analogamente a quanto riportato da Nyland and Mattoon, (1995), in questi animali, l'ultrasonografia non era in grado di differenziare lesioni maligne e benigne rappresentando ciò un limite di tale metodica. Per tale ragione, sebbene l'esame ecografico appaia molto sensibile nell'individuare lesioni vescicali, i rilievi ultrasonografici non assumono carattere tipizzante necessitando di conferma istopatologica.

Nel nostro studio l'esame ultrasonografico, utilizzato come primo approccio diagnostico strumentale, si è dimostrato di semplice esecuzione, rapido e ben tollerato dagli animali, consentendo nel contempo di individuare modificazioni a carico del viscere in tutti gli animali esaminati.

La tecnica ecografica ha consentito di evidenziare lesioni proliferative suggestive di neoplasia vescicale negli animali con macroematuria, mentre é risultata meno sensibile e specifica nei 6 animali con microematuria, in cui l'esame ultrasonografico ha mostrato unicamente un aumento dello spessore della parete del viscere. Va comunque precisato che il rilievo di forme proliferative in



corso di EEC non è sempre indicativo di neoplasia, in quanto le forme infiammatorie croniche associate a tale condizione possono anch'esse assumere un aspetto polipoide, e come tali andrebbero meglio caratterizzate attraverso prelievo bioptico. D'altro canto il rilievo ultrasonografico di ispessimento della parete vescicale, benché evidente in tutti i soggetti studiati, non permette da solo di formulare diagnosi di EEC, in quanto aspecifico e genericamente associato a cistite cronica (Lopez et al., 1990). In ogni caso, negli animali a pascolo, il rilievo all'ecografia di forme proliferative deve essere considerato un indice prognostico sfavorevole, soprattutto se associato ad episodi di macroematuria.

L'esame ultrasonografico presenta, altresì, l'indubbio vantaggio di poter valutare l'eventuale coinvolgimento delle strutture linfatiche regionali, fornendo importanti informazioni di natura prognostica. Nel presente studio l'interessamento dei linfonodi regionali è stato riscontrato nell'8,3% degli animali ammalati; questo rilievo appare in accordo con quanto riportato da Roperto e collaboratori (2010), che indicano un grado di metastatizzazione dell'8-10% in animali affetti da EEC.

Va altresì ricordato che tale metodica assume significato diagnostico fondamentale nei maschi affetti da EEC, nei quali l'impiego della cistoscopia è difficilmente praticabile per ovvie ragioni anatomiche.

I nostri risultati confermano che in corso di EEC la cistoscopia rappresenta il "gold standard" nella diagnosi e nella stadiazione delle lesioni della parete vescicale, in quanto consente di eseguire prelievi biopatici mirati. Inoltre, nel nostro studio la tecnica endoscopica ha evidenziato una notevole sensibilità diagnostica, svelando in tutti i

soggetti arruolati una condizione di EEC, indipendentemente dalla fase evolutiva della malattia e dal grado di ematuria presente.

Infatti negli animali con microematuria, e quindi, presumibilmente, in una fase non ancora avanzata della malattia, tale metodica ha permesso di svelare la presenza di strutture proliferative, piatte o bottoniformi, unitamente a piccole petecchie e soffiusioni, responsabili della presenza di sangue nelle urine.

I principali svantaggi nell'impiego di tale tecnica diagnostica risiedono nell'elevato costo dell'attrezzatura, talora non accettabile nella comune pratica di campo, indaginosità della metodica e scarsa praticità nel trasportare le attrezzature in luoghi spesso impervi e poco accessibili.

In considerazione di quanto affermato, il rilievo di macroematuria anche in un solo soggetto dovrebbe portare il buiatra a valutare tutti gli animali che condividono il pascolo, attraverso un semplice screening rappresentato dall'impiego di strisce reattive per l'esame delle urine. Tale metodica consente di svelare le insidiose forme occulte caratterizzate da una minima quantità di sangue nelle urine, che rappresenta il primo segno clinico di malattia. Successivamente gli animali positivi devono essere sottoposti ad un esame emocromocitometrico per valutare il grado di anemia, nonché ad indagini ematobiochimiche per indagare la funzionalità epato-renale.

Il "diagnostic plane" dell'EEC deve quindi prevedere l'impiego dell'ultrasonografia transrettale, con valutazione dell'intero apparato urinario, nonché dei linfonodi lomboaortici e iliaci.

Nel caso di estese lesioni a carattere proliferativo associate a macroematuria, è necessario predisporre la macellazione del soggetto, mentre gli animali con solo ispessimento, più o meno circoscritto, della parte vescicale associato a microematuria, dovrebbero essere allontanati

dai pascoli infestati e successivamente sottoposti a controlli semestrali, al fine di verificare una eventuale progressione/involuzione delle lesioni riscontrate. In questi ultimi può essere utile l'impiego della cistoscopia, nonostante i limiti oggettivi legati ai costi e alla scarsa praticità sui pascoli o in zone difficilmente accessibili. L'applicazione della cistoscopia comunque consente di studiare le lesioni attraverso il prelievo bioptico e quindi di formulare una prognosi più corretta.

Appare altresì chiaro che la diagnosi di EEC anche in un solo bovino implica, almeno in via teorica, lo spostamento dell'intera mandria in pascoli più salubri esenti da felce. La corretta applicazione di un tale protocollo può portare ad una riduzione considerevole delle forme di EEC invalidanti, riducendone così l'impatto economico negativo sulle realtà zootecniche di nicchia che rappresentano ancora un valore di biodiversità da tutelare.

## **BIBLIOGRAFIA:**

- **Alonso-Amelot, M.E.** And **Avendano, M.**- *Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence.* Current Medicinal Chemistry, 2002; **9**: 675-686.
- **Amin MB,** Young **RH**- *Intraepithelial lesions of the urinary bladder with a discussion of the histogenesis of urothelial neoplasia*- Seminars in Diagnostic Pathology, 1997; **14**: 84-97.
- **Anderson R.A.,** Scobie **L.,** O'Neil **B.W.,** Grindlay **G.J.,** Campo **M.S.**-*Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours*-Vet. Journal, 1997; **69**-78.
- **Appleton MAC,** Attanoos **RL,** Jasani **BJ.** - *Thrombomodulin as a marker of vascular and lymphatic tumours*- Histopathology 1996; **29**:153-157.
- **Balcos LG,** Borzacchiello **G.,** Russo **V.,** Popescu **O.,** Roperto **S.,** Roperto **F.,** *Association of bovine papillomavirus type-2 and urinary bladders tumours in cattle from Romania* - Res. Vet. Sci., 2008; Aug; **85** (1): 145-148.
- **Bick RL.** - *Alterations of haemostasis associated with malignancy: etiology, pathophysiology, diagnosis and management* - Semin Thromb Hemost **5**:1-26,1978.

- **Bjeldanes L.F.,** Chang G.W.- *Mutagenic activity of quercetin and related compounds* - Science (Washington DC), 1977; 197: 577-578.
- **Bodaghi S.,** Wood L.V., Robby G., Ryder C., Steiberg S.M, Zeng Z.M.- *Could human papillomavirus be spread through blood?* - J Clin Microbiol, 2005; 43: 5428-5434.
- **Borzacchiello G.,** Ambrosio V., Roperto S., Poggiali F., Tsirimonakis E., Venuti A., Campo M.S., Roperto F.- *Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas in cattle from the south of Italy* - Journal. Comp. Path. 2003; 128: 203-206.
- **Borzacchiello G.,** Iovane G., Marcante M.L., Poggiali F., Roperto F., Roperto S., Venuti A.- *Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumors in cows*- J. Gen. Virol. 2003; 84: 2921- 2926.
- **Borzacchiello G.,** Russo V., Spoleto C., Roperto S., Balcos L., Rizzo C., Venuti A., Roperto F.- *Bovine papillomavirus type-2 DNA expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle* - Cancer Letters, 2007; May 18; 250 (1): 82-91.
- **Borzacchiello G.,** Roperto F., *Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle* - Veterinary Research, 2008; 39:45.

- **Borzacchiello G.**, Russo V., Spoleto C., Roperto S., Balcos L., Rizzo C., Venuti A., Roperto F. - *Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle* - Cancer Lett., May 18; 250 (1): 82-91.
- **Bourin MC**, Lundgren-Akerlund E, Lindhal U. *Isolation and characterization of glycosaminoglycan component of rabbit thrombomodulin proteoglycan*. J Biol Chem 1990; 265:15424-31.
- **Braun U.** *Ultrasonographic examination of the left kidney, the urinary bladder, and the urethra in cows*. Zentralbl Veterinarmed A 1993;4012(1):1-9.
- **Buccheri G.**, Torchio P., Ferrigno D.,- *Plasma levels of D-dimer in lung carcinoma: clinical and prognostic significance*.- Cancer 2003; 97:3044-52.
- **Buntain B.**- *Disseminated intravascular coagulopathy in cow with left displaced abomasums, metritis, and mastitis*- Vet.Med. Small Animal Clin. 1990, 75(6): 1023-6.
- **Burkhardt A.**, Willingham M., Gay C., Jeang K.T., Schlegel R., *The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes*- 1989- Virology, 170: 334-339.

- **Burnett S.**, Jareborg N., DiMaio D., *Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue*- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 1992; 5665-5669.
- **Campo M. S.**, Jarrett W. F.H., Barron R., O'Neil B. W., Smith K.T., *Association of bovine Papillomavirus Type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle* - Cancer Research, 1992;52: 6898-6904.
- **Campo M.S.** - *Papillomavirus research (from natural history to vaccines and beyond)* - Caister Academic Press,2006.
- **Campo M.S.**, Anderson R.A., Cairney M., Jackson M.E. - *Bovine papillomavirus type 4: from transcriptional control to control of disease*- in "128<sup>th</sup> SGM Symposium- Viruses and Cancer ", A.C. Minson Editor, cambridge Univerity Press, 1994; 47-70.
- **Campo M.S.**, Jarrett W.F.H., O'Neil B.W., Barron R.J.- *Latent papillomavirus infection in cattle* - Res. Vet. Sci. 1994; 56: 151-157.
- **Campo M.S.**, O'Neil B.W., Barron R.J, Jarrett W.F.H., *Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle* - Carcinogenesis, 1994; 15: 1597-1601.

- **Campo M.S.** - *Bovine papillomavirus and cancer*-Veterin. Journal 1997, 154: 175-188.
- **Campo M.S.** - *Vaccination against papillomavirus in cattle*-Clinics in Dermatology, 1997; 15: 275-283.
- **Campo M.S.** - *Papillomavirus and disease in human and animals*-Vet. Comp. Oncol., 2003; Mar 1(1): 3-14.
- **Campo M.S.** -*Animal models of papillomavirus pathogenesis* - Virus Res, 2002; 89:249-261.
- **Carvalho T.**, Pinto C., Peleitero M.C.- *Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria* - J. Comp. Path. , 2006; 134: 336-346.
- **Castillo UF**, Ojika M., Alonso-Amelot ME, Sakagami Y. Ptaquiloside Z, - *A new toxic unstable sesquiterpene glucoside from the neotropical bracken fern Pteridium aquilinum var. caudatum.*- Bioorganic and Medicinal Chemistry, 1998; 9: 2229-2233.
- **Chang J.L.**, Tsao Y.P., Liu D. W., Huang S.J., Lee W.H., Chen S.L., -*The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix*,- J. Biomed Sci, 2001; 8: 206-213.



- **Chow N-H**, Cairns P., Eisenberger CF, Schoenberg MP, Taylor DC et al., *Papillary urothelial hyperplasia is a clonal precursor to papillary transitional cell bladder cancer*, - International Journal of Cancer, 2000; 89: 514-518.
- **Cines DB**, Pollack ES, Buck CA, et al - *Endotelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.*- Blood 91:3527 – 3561, 1998.
- **Corteggio A.**, Florio J., Roperto F. and G., Borzacchiello - *Expression of Gap Junction Protein Connexin 43 in Bovine Urinary Bladder Tumours.*- J Comp. Path. 2011, vol .144, 86-90.
- **Cota JB.**, Carvalho T., Pinto C., Peleteiro MC- *Epithelial Urinary Bladder Tumors from cows with Enzootic Hematuria: Structural and Cell Cycle-related protein expression.* -Vet Pathol- 2013, Aug 26; 51 (4): 749-754.
- **Costantini V**, Zacharski LR.-*Fibrin and cancer.* - Thromb Hemost 1993;69:406–14.
- **Crawford JM**, -*The origins of bladder cancer* - Laboratory Investigation, 2008; 88: 686-693.
- **Cybulsky MI**, Chan MK, Movat HZ, -*Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin- 1, and tumor necrosis factor and their implication in gram-negative infection.*- Lab. Invest., 1988; 58 (4):365-378.

- **De Medeiros JM**, Macedo M., Contancia JP, Nguyen C., Cunningham G., Miles DH - *Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores* – J Ethnopharmacol, 2000; Sept, 72 (1-2):157-165.
- **De Stefano V**, Finazzi G, Mannucci PM. - *Inherited thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes and management.*-Blood 1996; 87:3531-3544.
- **De Villiers E-M.**, Fauquet C., Broker T.R., Bernard H-U. And zur Hausen H. -*Classification of papillomavirus* - Virology, 2004; 324: 17-27.
- **Dittmann WA**, Majerus PW - *Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant.*- Blood 1990; 75:329-336.
- **Donati Mb**, Gambacorti- Passerinin C, et al -*Cancer procoagulant in human tumour cells: Evidence from melanoma patients.* - Cancer Res 46: 6471-6474, 1986.
- **Dvorak HF.** -*Thrombosis and cancer.*- Hum Pathol 1987;18:275–84.
- **Edwards RL.**, Rickles FR, Cronlund M. - *Mononuclear cell tissue factor generation.* - J Lab Clin Med1981; 98: 917-928.

- **Epstein JI**, Amin MB, Reuter VR -*Bladder biopsy Interpretation*- Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004; pp. 11-34.
- **Esmon CT**, Owen WG -*Identification of endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C.* - Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:2249-52.
- **Esmon CT.**-*Thrombomodulin as a model of molecular mechanism that modulate protease specificity and function at the vessel surface.*-FASEB J 1995; 9:946-55.
- **Esmon CT.**-*Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway.* - Tromb. Haemost. 1993; 70:29-35.
- **Evans WC**, Evans ET, Hughes LE - *Studies on bracken poisoning. Part III. Field outbreaks of bovine bracken poisoning.*- Brit Vet J **110**:426-442, 1954.
- **Evans I.A.**, Mason J, *Nature*, 1965; 208: 913-914.
- **Evans W.C.**, Bracken - *Thiaminase- mediated neurotoxic syndroms* - Bot. J. Linn. Soc. 73, 1976; 113-131.
- **Evans I.A.**- *The radiomimetic nature of bracken toxin* - Cancer Res. 28, 1968; 2252-2261.

- **Falanga A**, Rickles FR - *Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient.*- Semin Thromb Hemost 25: 173-182, 1999.
- **Ferguson JD**, Galligan DT, and Thornsen N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. J. DAiry Sci. 77: 2695-2703.
- **Francis JL**,Biggerstaff J, Amirkhosravi A. - *Hemostasis and Malignancy.*- Semin Thromb Hemost 1998;24:93-109,.
- **Fine SW**, Humphrey PA, Dehner LP, Amin MB, Epstein JI, - *Urothelial neoplasms in patients 20 years or younger: a clinicopathological analysis using the World Health Organization 2004 bladder consensus classification* - Journal of Urology, 2005; 174: 1976-1980.
- **Floeck M.**- *Ultrasonography of Bovine Urinary Tract Disorders-* Vet Clin Food Anim 25, 2009; 651-667.
- **Franz S.**, Winter Petra, and Baumgartner W. – *Cystoscopy in Cattle- A Valuable additional tool for clinical examination.*- Acta veterinaria ungarica 2004;52 (4); 423-438-.
- **Fukoka M**, Kuroyanagi M., Yoshishira K., Natori S.- *Chem. Pharm. Bull-* 1978; 26: 2365-2385.

- **Georgijev R**, Vrigosov A., Antonov S., Dimitrov A - *Versuche zur Feststellung der Anwesenheit kanzerogener Stoffe im Harn in mit Heu aus Hämaturiegebieten gefütterten Kühen* - Wien. Tierarztl. Mschr, 1963; 50:589-595.
- **Goldeberg RJ**, Seneff M., Gore JM, et al. - *Occult malignant neoplasm in patients with deep vein thrombosis.* - Arch Intern Med 147:251-253, 1987.
- **Goldstein D.J.**, Finbow T., Andresson T., Mc Lean P., Smith K., Bubb R., Schlegel R.-*Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16-K component of vacuolar H(+)-ATPases* - Nature 352 (1991) 347-349.
- **Hanson SR**, Griffin JH, Harker LA, et al. - *Antithrombotic effects of thrombin-induced activation of endogenous protein C in primates*- J. Clin. Invest. 1993; 92:2003-2012.
- **Hatama S.**, Nishida T., Kadota K., Uchida I., Kanno T., *Bovine papillomavirus type 9 induces epithelial papillomas on the teat skin of heifers* - Vet. Microbiol. 2009; May 12; 136 (3-4):347-351.
- **Henderson AH** - *Endotelium in control.*-Br. Heart J 1991; 65:116-125.
- **Hejna M**, Raderer M, Zielinski CC -*Inhibition of metastases by anticoagulants.* - JNCI 91:22-36, 1999.

- **Hejny k.,**-*Einsatz der Zystoskopie beim Wiederkauer.* Thesisi, University of Veterinary Medicine, Vienna. (1995).
- **Hirono I.,** Shibuya C., Fushimi K., Haga M. *Studies on Carcinogenic Properties of Bracken, Pteridium Aquilimum* -J. Natl. Cancer Inst. 45 (1970) 182-188.
- **Hirono I.,** Hosaka S., Kuhara K.-*Enhancement by bracken of induction of tumours of upper alimentary tract by N-propyl-N-Nitrosourethane,*- Br. J. Cancer 46 (1982) 423-427.
- **Hirono I.,** Aiso S., Hosaka S., Yamaji T., Haga M. -*Induction of mammary cancer in CD rats fed bracken diet,*-Carcinogenesis 4 (1983) 883-887.
- **Hirono I.,** Yamada K., Niwa H., Shizuri Y., Ojika M., Hosaka S., Yamaji T., Wakamatsu K., Kigoshi H., Niiyama K., Uosaki Y. - *Cancer Lett.*- 1984; 21: 239-246.
- **Hirono I,** Kono Y, Takahashi K, Yamada K, Niwa H, Ojika M, Kigoshi H, Hiiyama K, Uosaki Y - *Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent.* - Vet. Rec. 1984;**115**:375-378.
- **Honn KV,**Tang DG, Crissman JD - *Platelets and cancer metastasis: a casual relationship?*- Cancer Metastasis Rev 1992;11:325-351.

- **Hopkins NCG** - *Aetiology of enzootic haematuria* - Vet. Rec, 1986; 118:715-717.
- **Hoque M.,**- *Ultrasound examination of enzootic bovine haematuria affected cows.* - In: (eds), second Seminar cum Workshop on Current status, Diagnosis and Management of Enzootic Bovine Haematuria held w.e.f. 20-24<sup>th</sup> February, 2001 at Division of Pathology, IVRI, Izatnagar U.P. India.
- **Hoque M., Somvanshi R., Singh G.R., Mogha I.V.** - *Ultrasonographic Evaluation of Urinary Bladder in Normal, Fern Fed and Enzootic Bovine Haematuria- affected Cattle* - J. Vet: Med, 2002; 49:403-407.
- **Humphreys DJ** -*Veterinary Toxicology*, ed 3, London, 1988, Baillière Tindall, pp.258-262.
- **Iqbal S.** -*Role of thrombomodulin in cancer biology-* The Breast 9(2000), 264-266.
- **Iwan-Zietek I, Zietek Z., Kotschy M., Wolski Z., Wisniewska E., Zekanowska E.** -*Tissue type plasminogen activator antigen in urine of patients with bladder cancer* - Pol Merkur Lekarski, 1997 Jun; 2 (12): 366-367.
- **Iwan-Zietek I, Zietek Z., Kotschy M., Wolski Z., Chodakowska-Akolinska G.** - *The activity of protein C in the blood of patients*

*with bladder carcinoma* - Pol Merkur Lekarski, 1997;Jan; 2(9):193-195.

- **Jain NC**, in Shalm's Veterinary Hematology, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986:1787, 208,225.
- **Jarrett W.F.H.** - *The natural history of bovine papillomavirus infections.* - Advances in Viral Oncology, 1985: 5: 83-102.
- **Jarrett W.F.H.**, Mc Neal P.E., Grimshaw T.R, Selman I.E. And McIntyre W.I.M. -*High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomaviru-*, Nature, 1978; 274: 215-217.
- **Jubb KVF**, Kennedy PC, Palmer N - *Pathology of domestic animals*-ed 4, San Diego, 1993, Academic Press, pp. 534-536.
- **Kaneko J**, Harvey JW, Bruss M.L.- Clinical Biochemistry of Domestic Animals- ed 5, 1997- Appendix IX, pag.890-900.
- **Kigoshi H.**, Imamura Y., Mizuta K., Niwa H., Yamada K. - J. Am. Chem. Soc.; 1993; 115: 3056-3065.
- **Kiliç S**, Erguvan R, Ipek D, Gökçe H, Güneş A, Aydın NE, Baydınç C - *Eosinophilic cystitis. A rare inflammatory pathology mimicking bladder neoplasms.* - Urol Int. 2003;71(3):285-9.



- **Klaus Dieter Budres, Robert E.Habel-Pelvic cavity and inguinal region, including urinary and genital organs in Bovine Anatomy; prima edizione Scitersche, 2003- pag.82-86.**
- **Lane DA, Bayston TA. -*Molecular basis of antithrombin action and deficiency.* - In Schafer AI ed. *Molecular Mechanisms of Hypercoagulable States.* Austin, Landes Bioscience. 1997;49-77**
- **Lawley P.D.- in *Chemical Carcinogens (ACS Monograph 182), 2<sup>nd</sup> edn, ed. C.E. Searle, American Chemical Society, Washington D.C., 1984; vol.1 , ch. 7, pp. 325- 484.***
- **Lee JH, Ryu KW, Kim S, Bae JM. - *Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumor.*- *Hepatogastroenterology* 2004;51:1860–3.**
- **Lhindal AK, Sandset PM, Abildgaard U -*Indices of hypercoagulation in cancer as compared with those in acute inflammation and acute infarction.*- *Haemostasis* 20:253-262, 1990.**
- **Liess J.-*Die Endoskopie beim Rinde.*Habil., University of vet. Medicine, Hannover. 1936.**
- **Lioi M.B., Barbieri R., Borzacchiello G., Dezzi S., Roperto S., Santoro A., Russo V., Roperto F. - *Chromosome aberrations in***

*cattle with chronic enzootic Haematuria*, - J. Comp. Path., 2004; 131: 233-236.

- **Lopez-Beltran A**, Montironi R - *Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification* - European Urology, 2004; 46: 170-176.
- **Lopez-Beltran A**, Sauter G., Gasser T., Hartmann A., Scmitz-Dräger BJ et al. - *Infiltrating urothelial carcinoma* - World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterherm IA, Eds., IARC Press, Lyon, pp. 93-97.
- **Majewski T.**, Lee S, Jeong J, Yoon DS, Kram A., et al. - *Understanding the development of human bladder cancer by using a whole-organ genomic mapping strategy* - Laboratory Investigation, 2008; 88: 694-721.
- **Manos M.M.**, Thing J., Wright D.K., Lewis A.I., Broker T.r.,Maxie MG, Newman SJ- *Urinary system* - In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, ed. Maxie MG, 5th ed., vol 2, pp. 518-520. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 2007.
- **McKenzie R.A**- *Bovine enzootic haematuria in queensland (F)* - Aust. Vet. J. 54, 1978: 61-64.

- **Meuten DJ.**- *Tumors of the urinary bladder and urethra.*- In: Tumors in Domestic Animals, DJ Meuten, Ed., Iowa State Press, Ames, 2002; pp. 524-546.
- **Mitra AP, Cote RJ** - *Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer* - Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2009; 4: 251-285.
- **Montironi R, Lopez-Beltran A** - *The 2004 WHO Classification of bladder tumours: a summary and commentary* - International Journal of Surgical Pathology, 2005; 13: 143-153.
- **Nakayasu M, Sakamoto H., Terada M., Nagao M., Sugimura T.,** - *Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture.* -Mutat. Res., 1986; 174:79-83.
- **Nemerson Y.** -*The tissue factor pathway of blood coagulation.* - Semin Thromb Hemost 1992;29:170–6.
- **Nierodzik M L, Plotkin A, Kajumo S.** -*Thrombin stimulates tumour platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo.*- J Clin Invest 1991; 87: 229±236.
- **Niwa H., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Hirono I., Matsushita K.,** *Tetrahedron Lett.*, 1983; 24: 4117-4120.
- **Nyland T.G., Mattoon J.S.,** 1995 - *Veterinary Diagnostic Ultrasound.*- W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, USA.

- **Oelrichs P.B.**, Ng J.C., Bartley J.-*Phytochemistry*-1995; 40: 53-56.
- **Ogawa T.**, Tomita Y., Okada M., Shirasawa H., -*Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7*- J. Gen. Virol., 2007; 88: 1934-38.
- **Ojika M.**, Kigoshi, Kuyama H., Niwa H., Yamada K. - *J. Nat. Prod.*-1985; 48: 634-637.
- **Ojika M.**, Wakamatsu K., Niwa H., Yamada K. - *Tetrahedron*, 1987; 22: 5261-5274.
- **Olson C.**, Pamukcu, A.M., Brobst, D.F., -*Papilloma like-virus from bovine urinary bladder tumors.*- Cancer Res. 1965; 25: 840-849.
- **Oswiler GD**, Ruhr P- *Plants affecting blood coagulation.* - In Howard JL, ed: Current Veterinary Therapy 3: Food Animal Medicine, Philadelphia, 1986, WB Saunders, pp. 404-406.
- **Otten N.**, von Tscherner C., Lazary S., Antczak D.F., Gerber H. - *DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing.*- Arch Virol, 1993; 132: 121-131.

- **Oya M.,** Akiyama Y., Okuyama T., Ishikawa H. -*High preoperative plasma D-dimer level is associated with advanced tumour stage and short survival after curative resection in patients with colorectal cancer.*- Jpn J Clin Oncol 2001; 31:388-94.
- **Pamukcu A.M.,** Erturk E., Yalciner S., Milli U., Bryan G.T. - *Cancer Res.*, 1978; 38: 1556-1570.
- **Pamukcu A.M.,** Price J.M., Bryan G.T. - *Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumours* - *Veterinary Pathology*, 1976; 13: 110-122.
- **Pathania S.,** Dhama K., Saikumar G, Shahi S, Somvanshi R. – *Detection and quantification of bovine papilloma virus type 2 (BPV-2) by real-time PCR in urine and urinary bladder lesions in enzootic bovine hematuria (EHB)- affected cows* – *Transbound Emerg Dis*, 2012 Feb; 59 (1): 79-84.
- **Pathania S.,** Kumar P., Devi LG, Kumar D., Dhama K., Somvanshi R. – *Preliminary assessment of binary ethylenimine inactivated and saponized cutaneous warts (BPV-2) therapeutic vaccine for enzootic bovine haematuria in hill cows.* – *Vaccine* 29 (2011); 7296-7302.
- **Park Hk,** Paick Sh., Oh Sj, Kim Hm- *Ureteroscopic lithotripsy under local anesthesia: analysis of the effectiveness*

and patient tolerability. *European Urology* (2002)- 45(5), 670-673.

- **Pelagalli G.V.**, Botte V.- Apparato urogenitale in *Anatomia Veterinaria sistematica e comparata*; terza edizione, Edi-ermes-cap.8, pag.376-393.
- **Pennie W.D.**, Grindlay G.J., Cairney M., Campo M.S. - *Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4* - *Virology* 193, 1993; 614-620.
- **Peretti V.**, Ciotola F., Albarella S., Russo V., Di Meo GP, Iannuzzi L., Roperto F., Barbieri V. - *Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic hematuria* - *Mutagenesis*,- 2007 Sep ; 22 (5): 317-320
- **Philip M.**, Rowley DA, Schreiber H -*Inflammation as a tumour promoter in cancer induction*- *Semin Cancer Biol*, 2004 Dec; 14 (6): 433-439.
- **Pires I.**, Filipe S., Queiroga FL., Rodrigues P., Henriques R., Pinto C., Lopes C. – *Epithelioid hemangiosarcomas of the bovine urinary bladder: a histologic, immunohistochemical, and ultrastructural examination of four tumors.* – *J Vet Diagn Invest* (2010) 22:116-119.
- **Prakash AS.**, Pereira TN, Smith B.L. Shaw G., Seawright AA, *Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras*

*activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside* - Natural Toxins- 1996; **4**: 221-227.

- **Radostitis, O.M.**, Blood, D.C. and Gay, C.C.- (1994) Veterinary Medicine, 8<sup>th</sup> edition. Baillière Tindall, 1559-1562.
- **Radostits OM**, Gay CC, Hinchcliff KW, et al. *Diseases of the urinary system*. - In: Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, editors. Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th edition. Edinburgh: Saunders Elsevier; 2007. p. 543–73. rasound. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998. p. 273–363.
- **Raghavan D**, Shipley WU, Garnick MB, Russell PJ, Richie JP, - *Biology and management of bladder cancer* - N Engl J Med(1990) 322:1129-1138.
- **Reef VB**. - *Adult abdominal ultrasonography*. - In: Reef VB, editor. Equine diagnostic ult 9.
- **Reuter VE** - *Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high grade*- In: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, JN Eble, sauter G., Epstein JI, Sesterhenn, Eds., IARC Press, Lyon, 2004; pp. 117-118.
- **Rickles FR**, Edwards RL, Barb C, et al - *Abnormalities of blood coagulation in patients with cancer*. - Cancer 51: 301-307, 1983.

- **Rickles FR.**, Levine M., Edwards RL. - *Emostatic alterations in cancer patients* -Cancer metastasis Rev., 1992; Nov; 11 (3-4):237-248.
- **Risau W.**- *Differentiation of endothelium.*-FASEB J. 1995; 9:926-933.
- **Roperto S.**, Brun R., Paolini F., Urraro C., Russo V., Borzacchiello G., Pagnini U., Raso C., Rizzo C., Roperto F., Venuti A.-*Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumors: possible biological role*, - Journal of General Virology, 2008; 89: 3027-3033.
- **Roperto S**, Borzacchiello G, Brun R., Leonardi L., Maiolino P., Martano M., Paciello O., Papparella S., Restucci B., Russo V., Salvatore G., Urraro C., Roperto F. -*A review of Bovine Urothelial Tumours and Tumour-Like Lesions of the Urinary Bladder* - J.Comp.Path, 2009; Oct. 7.
- **Roperto S.**, Borzacchiello G, Casellato R, Galati P., Russo V., Sonnino V., Roperto F. -*Sialic Acid and GM3 Ganglioside Expression in Papillomavirus-associated Urinary Bladder Tumours of Cattle with Chronic Enzootic Haematuria* - J.Comp. Path, 2007; 137: 87-93.



- **Rosenberger G.**, Heeschen W., Dtsch Tieraerztl. Wochenschr., 1960; 67: 201-208.
- **Sadler JE.**- *Thrombomodulin structure and function.* - Thromb. Haemost. 1997; 78:392-395
- **Sardon D**, de la Fuente I, Calonge E, Perez- Alenza MD, Castaño M et al. *H-ras immunohistochemical expression and molecular analysis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern,*- Journal of Comparative Pathology, 2005; 132: 195-201.
- **Scala C.**, Ortiz K, Catinaud J, Lemberger K.- *Hematuria and urinary bladder lesions compatible with bracken fern (Pteridium aquilinum) intoxication in captive fallow deer (Dama dama)*- j.Zoo Wildl Med, 2014 Jun; 45(2):380-5.
- **Schafer AI.**- *Hypercoagulable states: Molecular genetics to clinical practice.*- Lancet 1994; 344:1739-1742
- **Schafer AI** -*Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders*- Blood 69: 187-191, 1987.
- **Schafer AI.***Vascular endothelium: In defence of blood fluidity.* - J.Clin. Invest. - 1997; 99:1143-1144.

- **Shahin M.**, Moore M.R., Worrall S., Smith B.L., Seawright A.A., Prakash A.S. - *H-ras activation is an early event in the ptaquiloside- induced carcinogenesis: comparision of acute and chronic toxicity in rats* - Biochemical and Biophysical Research Communications. 1998; 250: 491-497.
- **Shahin M.**, Smith B.L., Worrall, Moore M.R., Seawright A.A. - *Nat. Toxins* - 1996; 4: 221-227.
- **Shahin M.**, Smith B.L,Worrall S. ,Moore M.R, Seawright A.A., Prakash A.S - *Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats* -Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998; 244: 192-197.
- **Shahin M.**, Moore M.R.,Worrall S., Smith B.L, Seawright A.A, Prakash A.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1998; 250: 491-497.
- **Sharma R.**, Bhat TK, Sharma OP.- *The environmental and human effect of ptaquiloside- induced enzootic bovine hematuria: tumorous disease of cattle.*-Rev. Environ Contam toxicology 2013; 224: 53-95.
- **Slungaard A.**, Vercellotti GM, TranT, Gleich GJ, Key NS - *Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function. A potential mechanism for thromboembolism in*

*hypereosinophilic heart disease*- J Clin Invest, 1993;Apr; 91 (4):1721-1730.

- **Smith B.L.**, Shaw G., Prakash A.S., Seawright A.A. - *Studies on Dna formation by ptaquiloside, the carcinogen of bracken ferns (Pteridium spp.)* - in: S.M. Colegate, P.R. Dorling (Eds), Plant Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical and Ecological Aspects, CAB International, Wallingford, UK, 1994; pp. 167-172.
- **Smith, B.L.**-*The toxicity of bracken fern (genus Pteridium) to animals and its relevance to man.*- Handbook of Plant and Fungal Toxicants, J.P.F. D'Mello, Ed., CRC Press, London, 1997; 63-76.
- **Smith B.L.**, Seawright A.A., Ng J.C., Hertle A.T., Thomson J.A., Bostock P.D. -*Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (Pteridium spp), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia* - Nat. Toxins 2, 1994; pp. 347-353.
- **Smith B.L.**, Embling P.P., Agnew M.P., Lauren D.R., Holland P.T.-*Carcinogenicity of bracken fern (Pteridium esculentum) in New Zealand* - N.Z. Vet. J. 36, 1988; 56-58.
- **Somogyi J.C.** -*On antithiamine factors of fern* - J. Vitaminol. 17, 1971: 165-174.
- **Somvanshi R.**, Pathania S., Nagarajan N., Pangty K., Kumar P. – *Pathological study of non-neoplastic urinary bladder lesions in*

*cattle and buffaloes: a preliminary report.*- Trop. Anim Health Prod, 2012; 44:855-861.

- **Somvanshi R.**- *Papillomatosis in buffaloes: a less-know disease*- Transbound Emerg Dis, 2011 Aug; 58(4): 327-32.
- **Suehiro T**, Shimada M, Matsumada T, Yamamoto K, Sugimachi K. *Thrombomodulin inhibits intrahepatic spread in human hepatocellular carcinoma* - Hepatology 1995;21:1285-90.
- **Tan TT**, Coussens LM - *Humoral immunity, inflammation and cancer* - Curr Opin Immunol, 2007, Apr; 19 (2):209-216 .
- **Taylor J.A.** -*The bracken problem: a global perspective* -AIAS Occasional Publication, No. 40, 1990; pp. 3-19.
- **Tomita Y.**, Literak I., Ogawa T., Jin Z., Shirasawa H., *Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison* - Virus Genes, 2007;35: 243-249.
- **Trousseau A.**-*Phlegmasia alba dolens*. -Lecture on clinical medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris. London: new Sydenham Society, 1872; pp.281-295.
- **Tryon R.M.** - *A revision of the genus pteridium*,-J.N. Engl. Bot. Club 43, 1941; pp. 1- 66

- **Unsal E**, Atalay F, Atikcan S, Yilmaz A. -*Prognostic significance of hemostatic parameters in patients with lung cancer.*- Respir Med 2004; 98:93-8
- **Van Boven HH**, Lane DA. - *Antithrombin and its inherited deficiency states.*- Semin. Haematol. 1997; 34:188-204
- **Van der Hoeven J.C.M.**, Lagerweij W.J., Posthumus M.A., van Veldhuizen A., Holterman H.A.J., *Carcinogenesis*, 1983; 4: 1587-1590.
- **Van de Water L**, Tracy PB, Aronson D, et al - *Tumour cell generation of thrombin via prothrombinase assembly.*-Cancer Res 45: 5521-5525, 1985.
- Venuti A., Campo M.S., The E5 protein of papillomavirus, in: D. McCance (Ed.), human Papillomavirus- Perspectives in medical Virology, vol.8, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2002, pp.143-164.
- **Villalobos-** Salazar J., Meneses A, Rojas J.L., Mora J., Porras R.E., Herrero M.V. -*Bracken derived carcinogens as affecting animal health and human health in Costa Rica*, presented at International Bracken Group Meeting, Bangor, Wales, 1989.
- **Urraro C.**- Aspetti clinici, anatomopatologici e profile emocoagulativo in bovini podolici affetti da EEC- tesi di dottorato, 2009.

- **Watson W.A.**, Barnett K.C., Terlecki S.- Vet. Rec., 1965; 77: 1060-1069.
- **Weiss DS**, Wardrop KS,- Shalm's Veterinary Hematology- sesta edizione, editore Wiley-Blackwell-2010.
- **Wolinsky S.M.**- *Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus* - Cancer Cells, 1989; 7: 209-214.
- **Wosiacki SR**, Barreiro MAB, Alfieri AF, Alfieri AA- *Semi-nested PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type-2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria*, - Journal of Virological Methods, 2005; 126: 215-219.
- **Wosiacki SR**, Claus MP, Alfieri AF, Alfieri AA - *Bovine papillomavirus type-2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria*, - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2006; 101: 635-638.
- **Wu KK**, Thiagarajan P - *Role of endothellium: in thrombosis and hemostasis*.-Annu Rev Med 47:315-331, 1996.
- **Yamada K**, Ojika M., Kigoshi H., Sugiura Y. -*A bracken carcinogen: chemical studies and interaction with DNA* - Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1998; Jun; 33 (3): 305-309.

- **Yamada K.**, Makto O., Kigoshi H.,-*Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology.*- Natural Product Reports, 2007; **24**: 798-813.
- **Zacharski LR**, Wojtukiewicz Mz, Costantini V, Ornstein D,Memoli VA. -*Pathways of coagulation fibrinolysis activation in malignancy.*- Semin Thromb Hemost 1992;18:104–16.
- **Zietek Z.**, Iwan-Zietek I, Kotschy M., Wolski Z., Wisniewska E. - *Fibrinolysis process in the blood of patients with bladder carcinoma*- Pol Merkur Lekarski, 1997; Dec; 3(18):269-270.
- **Zietek Z.**, Iwan-Zietek I, Kotschy M., Wiesniewska E., Tyloch F.- Pol Merkur Lekarski- 1997; Jan; 2(9):191-192.