

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA
Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie
Sezione di Clinica Medica**



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

(Coordinatore: Prof. Paolo Ciaramella)

**Aspetti clinici, anatomopatologici e profilo
emocoagulativo in bovini podolici affetti da ematuria
enzootica cronica (EEC)**

**Docente Guida:
Ch.mo Prof. Paolo Ciaramella**

**Tesi di dottorato della:
D.ssa Chiara Urraro**

**XXII DOTTORATO DI RICERCA
2006-2009**

INDICE

Introduzione

1.1 Eziopatogenesi dell'Ematuria Enzootica Cronica

1.1.1 Struttura e proprietà della ptaquiloside

1.1.2 Reattività del dienone (APT) nei confronti di composti organici

1.1.3 Alchilazione e clivaggio nei confronti del DNA

1.2 Il ruolo dei papillomavirus nella genesi del cancro vescicale

1.2.1 BPV-2 E5

1.3 Sintomatologia

1.3.1 Sintomatologia clinica e decorso

1.4 Diagnosi

1.4.1 Esami di laboratorio

1.4.2 Diagnosi strumentale

1.5 Quadro necroscopico ed istologico

1.6 Emostasi e funzione endoteliale: ruolo della proteina C, della proteina S, della ATIII e del di-dimero.

1.7 Cenni sul ruolo svolto dal sistema emocoagulativo nei processi neoplastici

Parte Sperimentale

Materiali e metodi

Risultati

Discussione

Tavole raffigurative

Bibliografia

INTRODUZIONE

L'Ematuria Enzootica 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.

Le neoplasie a carico della vescica urinaria dei bovini sono alquanto rare e costituiscono solo lo 0,001% di tutte le neoplasie maligne riscontrate in tale specie animale (Meuten, 2002). Numerose indagini condotte su animali affetti da ematuria cronica hanno permesso di identificare che, alla base di tale affezione, è presente una condizione di intossicazione cronica da felce aquilina (*Pteridium aquilinum*)[Fig.1], pianta cosmopolita contenente numerose sostanze immunosoppressive, clastogene e carcinogenetiche (Smith et al., 1997;Alonso-Amelot et al.,; 2002; Yamada et al.,2007;).

La felce aquilina, 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 (Fig.3), il cui colore varia da giallo-verde a verde-rossastro nel periodo autunnale (Fig.5). 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.2)

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).

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 $\mu\text{g/g/s.s.}$), mentre in aree dove la malattia non è presente, o assume un carattere sporadico, la concentrazione di tale sostanza risulti inferiore a 100 $\mu\text{g/g/s.s.}$ (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 nell'oncogenesi di tale affezione (Campo ed 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 ed 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

L'Ematuria Enzootica 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 ed assunta in notevoli quantità dagli animali al pascolo soprattutto quando presente allo stadio germinativo, durante il quale si presenta tenera e facilmente commestibile. Anche pecore e bufali esposti ad ingestione di felce per periodi superiori ai due anni possono contrarre la malattia (Radostitis, 1994). I bovini di età superiore ad un anno sono più frequentemente colpiti senza alcuna predisposizione di età, sesso e razza.

L'ematuria enzootica si presenta come problematica ambientale che interessa intere aree con notevoli 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.

Dal punto di vista clinico la malattia evolve in forma subacuta o più frequentemente cronica. Nei rari casi di 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.

La diagnosi si basa su rilievi clinici diretti quali, ematuria, dimagrimento, pallore delle mucose ecc. associati alla presenza di emazie nelle urine ed anemia, la cui gravità è in funzione del tempo di insorgenza della malattia.

Il fattore temporale è un altro importante elemento di tale affezione ed in particolare per quanto attiene le modificazioni del profilo emocoagulativo. 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, per cui viene lasciato pascolare liberamente in terreni contaminati favorendo in tal modo la progressione della malattia. L'organismo risponde con modificazioni dell'emostasi che con il tempo possono alterarsi fino alla comparsa, nei casi letali, di forme di coagulazione intravasale disseminata (CID).

Sicuramente, in corso di ematuria enzootica bovina un momento patogenetico di cruciale importanza è rappresentato dal

danno dell'endotelio vasale. Ciò fa ritenere che la disfunzione endoteliale rappresenti una parte integrante dei meccanismi fisiopatologici che determinano l'evoluzione della malattia. L'endotelio vascolare è considerato attualmente un importante organo endocrino, che svolge un ruolo critico di interfaccia tra circolazione sanguigna ed i tessuti corporei, intervenendo in numerose funzioni regolatorie. La sua azione si esplica sia con proprietà pro-trombotiche che anti-trombotiche costituendo un importante sistema di equilibrio emocoagulativo conosciuto con il termine di "bilancia emostatica endoteliale". In condizioni di integrità, l'endotelio è in grado di assicurare la fluidità del sangue mediante un complesso meccanismo anticoagulante; al contrario, se esso viene lesa il danno delle cellule endoteliali costituisce il segnale di innesco del processo emostatico. Nei pazienti umani esistono numerose evidenze cliniche che attestano l'associazione fra disfunzione endoteliale e condizioni di ipercoagulabilità ematica. Tale condizione è particolarmente studiata nei pazienti oncologici, nei quali, già dal 1865 ad opera del Prof. Trousseau, fu descritta una correlazione fra carcinoma gastrico e trombosi venosa profonda. Successivamente a questo primo pionieristico studio, mediante tecniche diagnostiche più avanzate, come la microscopia elettronica e l'immunoistochimica, è stato possibile mettere in evidenza nei tumori primari e metastatici, la presenza di fibrina che, come è noto, rappresenta l'elemento finale della cascata emocoagulativa (Cybulsky, Chan and Movat; 1988). Le cellule maligne vengono inoltre chiamate in causa nella

disfunzione endoteliale, in quanto direttamente sono in grado di svolgere attività procoagulanti così come dimostrato dall'espressione del fattore tissutale. Altri studi (Zacharsky et al., 1992) hanno invece dimostrato come le cellule tumorali siano in grado di stimolare la fibrinolisi. In condizioni fisiologiche tale processo porta all'attivazione del plasminogeno in plasmina, quest'ultima promuovendo la lisi della fibrina con produzione di prodotti di degradazione.

Sulla base di tali elementi patogenetici, nel corso degli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi test diagnostici in grado di svelare marker indicativi di processi coagulativi e di fibrinolisi aberranti in pazienti affetti da neoplasie maligne.

In particolare, Rickles e collaboratori (1992), hanno approfondito le modificazioni dei livelli plasmatici di inibitori della coagulazione, evidenziando una riduzione dell'attività dell'antitrombina III, proteina C, proteina S ed un aumento dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno in pazienti affetti da neoplasie maligne. Del tutto assenti sono le informazioni attinenti il profilo emocoagulativo in corso di ematuria enzootica del bovino.

Scopo delle nostre indagini, che formano l'oggetto della presente tesi di dottorato, è quello di descrivere gli aspetti clinici, anatomopatologici ed il profilo emocoagulativo in 48 bovini affetti da ematuria enzootica, esaminati nell'ambito del Progetto di ricerca di interesse Nazionale (PRIN) per l'anno 2008 dal titolo "Meccanismi patogenetici e rilievi clinico-diagnostici nei

tumori vescicali del bovino caratterizzati da ematuria cronica”. La dimostrazione di una possibile associazione tra modificazioni emocoagulative e quadro clinico nonché anatomopatologico, potrebbe contribuire a meglio comprendere i complessi meccanismi eziopatogenetici che sono alla base dell’oncogenesi tipica di tale affezione.

I risultati delle presenti indagini saranno preceduti da una trattazione sulle più recenti acquisizioni eziologiche, patogenetiche, nonché clinico-diagnostiche, riguardanti l’ematuria enzootica cronica del bovino (EEC).

1.1 - Eziopatogenesi dell'Ematuria Enzootica Cronica

L'eziologia dell'ematuria enzootica 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**.

1.1.1 - Struttura e proprietà 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 B e 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.

1.1.2 - Reattività 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.

1.1.3 – 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 β -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 ed altri, 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-asica 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.

Ancora oggi risultano sconosciute 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). (Schema pag. 83)

1.2 - Il ruolo dei Papillomavirus nella genesi 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 M.S., Papillomavirus research ,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).

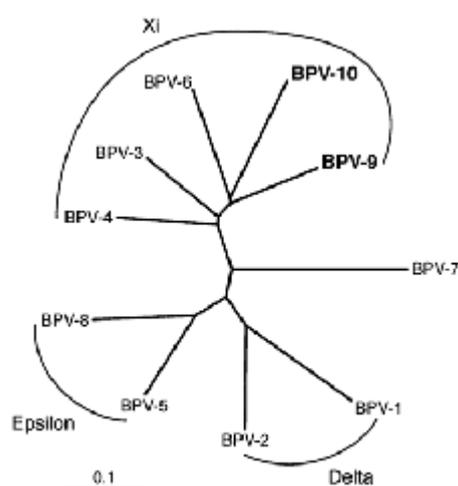


Fig. 13. Albero filogenetico e classificazione dei Papillomavirus bovini (da Hatama et al., 2008)

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 (Fig. 13.)

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

<u>Δ papillomavirus:</u> (fibropapillomi)	BPV-1: testa, capezzoli, pene BPV-2: testa, dorso
<u>ε papillomavirus: (misti)</u>	BPV-5: capezzoli, mammelle BPV-8: capezzoli, cute
<u>Ξ papillomavirus: (papilloma)</u>	BPV-3: dorso BPV-4: tratto superiore GI BPV-6: capezzoli, mammelle BPV-9: capezzoli BPV-10: capezzoli
<u>Nuovo genere:</u>	BPV-7: cute, capezzoli

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 M.S., Papillomavirus research, 2006). (Tab. 1)

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 immuno-incompetenti 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 papillomatosiche 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 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 ed altri, 1992; Roperto ed altri, 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).

1.2.1 BPV-2 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⁺-ATPase alterandone la sua funzione acidificante del lume dei compartimenti intracellulari (Goldstein et al., 1991).

1.3 - Sintomatologia

1.3.1 - Sintomatologia clinica e decorso

Come già accennato in premessa, a seconda della quantità di felce assunta attraverso l'alimentazione ed in funzione della durata del tempo di esposizione alla 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 soffusioni 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. Particolare interesse è la presenza di altri animali allevati nelle stesse aree interessate e che mostrano di 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*** è 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, uno scarso body condition score. 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 cefosi 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 erigono vescicale, con conseguente occlusione ureterale.

1.4 - Diagnosi

1.4.1 - 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, in particolare, gli animali in cui non è presente una evidente ematuria; dopo opportuna centrifugazione l'esame del sedimento permette negli animali malati la visione di emazie, la cui concentrazione può notevolmente variare fino, in alcuni casi, a raggiungere concentrazioni di oltre 250 μ L. 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. La presenza di una linfopenia marcata e duratura può inoltre favorire una condizione immunosoppressiva che favorisce la comparsa di quadri setticemici con conseguente morte improvvisa

Nei bovini colpiti può essere di aiuto, anche ai fini della diagnosi differenziale, effettuare un profilo ematochimico comprendente la funzionalità epato-renale (azotemia, creatininemia, glicemia, enzimi epatospecifici, assetto lipidico, quadro proteico elettroforetico), nonché specifiche indagini parassitologiche e sierologiche ed emocoagulative (PT, APTT e

fibrinogeno).

1.4.2 - Diagnosi strumentale

La diagnostica strumentale si avvale invece dell'impiego della cistoscopia e dell'ecografia transrettale.

Per una corretta esecuzione dell'esame ecografico risulta necessario lo svuotamento del retto dall'accumulo di feci ed un buon riempimento vescicale. Lo studio ecografico della vescica nel bovino, previo idoneo contenimento, può essere eseguito mediante sonde endocavitarie ad elevata frequenza per via transrettale. In sede di esame vengono eseguite scansioni longitudinali e trasversali volte ad esplorare la totalità dell'organo. Gli elementi ecografici da ricercare sistematicamente durante l'esame sono rappresentati dalla valutazione della forma della vescica, dello spessore della sua parete ($> 2\text{mm}$) (Nyland and Mattoon, 1995; Hoque, 2001), dalla presenza del jet di flusso uretrale e del rapporto che la vescica stabilisce con gli organi vicini.

L'esplorazione ecografica della vescica del bovino permette di studiare in maniera metodica diverse sedi anatomiche quali il corpo, il fondo ed il collo. Più precisamente con la valutazione del trigono, è possibile studiare i rapporti anatomico funzionali degli ureteri e del tratto uretrale. Negli animali malati 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. Non infrequente è il rilievo di echi mobili nel lume vescicale, sprovvisti di ombra acustica posteriore, indicativi di coaguli di varie dimensioni

L'esame ecografico deve comunque essere esteso a tutto l'apparato urinario con particolare attenzione a quello renale al fine di verificare l'eventuale presenza di pielonefrite/idronefrosi. In caso di cistite è possibile osservare ispessimento focale o diffuso della parete; nelle forme croniche è possibile inoltre rilevare aspetti di tipo proliferativi circoscritto o diffuso con margini irregolari fino a simulare forme vegetanti pseudo-neoplastiche.

Molto scarsi sono gli studi studi ultrasonografici in corso di ematuria enzootica. Hoque et al., (2002) hanno riscontrato nella maggioranza degli animali esaminati un significativo ispessimento dalla parete vescicale associata talvolta a forme vegetanti. Al pari di quanto riportato da Nyland and Mattoon,

(1995), in questi animali, l'ultrasonografia non è stato in grado di differenziare il pattern tessutale coinvolto rappresentando un limite della metodica. Per tale ragione va precisato che la diagnosi ultrasonografica non assume carattere patognomonico e necessita, quindi, di un approfondimento attraverso la biopsia eseguita durante l'esame cistoscopico che attualmente rappresenta il "gold standard" diagnostico.

L'esame cistoscopico della vescica costituisce infatti un valido esame strumentale in quanto permette una visione diretta della intera parete vescicale e delle eventuali lesioni presenti consentendo altresì il prelievo di tessuti con possibile diagnosi "*in vitam*"; ciò permette di formulare una prognosi accurata ed un intervento terapeutico precoce. E' infatti possibile effettuare almeno tre campioni biopsici, provenienti da fondo, collo e trigono vescicale che verranno posti in formalina e/o azoto liquido, possono essere utilizzati per eseguire indagini istopatologiche, immunoistochimiche e di diagnostica molecolare.

All'esame cistoscopico la mucosa vescicale normale si presenta di un colorito variabile dal bianco al giallo con superficie liscia e lucida e trama vascolare poco accentuata. In corso di ematuria enzootica cronica la mucosa dell'organo appare ispessita, piegata su se stessa di colorito giallastro con trama vascolare accentuata; si osservano, comunemente focolai emorragici di varie dimensioni soprattutto a livello del trigono vescicale o delle pareti accompagnante da lesioni a placca o a

“cavolfiore” protese verso il lume vescicale. Infine nel lume dell’organo è di facile il rilievo di coaguli talvolta di dimensioni grandi quanto una piccola noce.

1.5 - Quadro necroscopico ed istologico

All'esame post mortem i tessuti della carcassa appaiono pallidi mentre la parete vescicale risulta ispessita 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. 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 2004, 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).

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** (Fig.8) 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** (Fig.9) 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. (Fig. 12).

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** (Fig.10) 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. (Fig.11)

Il **carcinoma uroteliale papillare di basso grado di malignità** è caratterizzato da fronde papillari di urotelio apparentemente ordinata, ma tali tumori mostrano disordine architettoneco 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 cacinoma 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.

In conclusione la diagnosi definitiva di ematuria enzootica si basa essenzialmente sulla presenza di micro-macroematuria associata ad anemia ed al rilievo di lesioni della mucosa vescicale osservati all'esame cistoscopico unitamente all'esame

istologico delle stesse.

1.6 - Emostasi e funzione endoteliale: ruolo della proteina C, della proteina S, della ATIII e del dimero.

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 ipereosinofile 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. È 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 trombinica-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 γ -carbossigluttammico (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 a 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.

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 PGI₂ 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_a, X_a, XI_a, XII_a, 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 fibriniformazione e fibrinolisi.

1.7 - 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-secerenti, 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- α) ed interleuchina-1 (IL-1 β) 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 sono state esaminate, durante il periodo compreso tra il mese di Marzo 2007 ed il mese di Giugno 2009, 48 bovini affetti da ematuria enzootica cronica, di razza podolica, femmine, di età compresa tra i 3 e 20 anni, provenienti da allevamenti condotti allo stato brado e/o semibrado ubicati in diverse aree del Centro-Sud Italia, i cui pascoli risultano notoriamente ricchi di *Pteridium aquilinum*. La diagnosi clinica di EEC è stata effettuata attraverso il rilievo di emazie nelle urine e confermata, successivamente dall'esame anatomopatologico in seguito a macellazione; in 13 animali la diagnosi è stata altresì effettuata "in vitam" attraverso l'analisi dei campioni biotici della mucosa vescicale ottenuti mediante cistoscopia;

Tutti gli animali sono stati sottoposti ad esame clinico completo con particolare riferimento all'esame obiettivo particolare dell'apparato urinario unitamente a prelievo di sangue ed urine.

L'esame delle urine è stato effettuato utilizzando strisce reattive commerciali (Combur test Roche – Swiss); particolare attenzione è stata rivolta all'esame del sedimento, finalizzato a discriminare forme occulte di microematuria ovvero a confermare la presenza di globuli rossi nei casi di ematuria manifesta, nonché, infine 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); sono stati inoltre allestiti strisci ematici, al fine di poter valutare la formula leucocitaria, la morfologia degli elementi globulari, la stima piastrinica ed 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 delle seguenti esami ematochimici: azotemia, creatininemia, glicemia, creatinifosfochinasi (CPK), aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), fosfatasi alcalina (ALP), sorbitolo deidrogenasi (SDH), 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, con metodo cinetico, della ALP, SDH, LDH, CPK e GGT. Si è proceduto infine ad eseguire indagini sierologiche e parassitologiche al fine di escludere le più comuni patologie a carattere infettivo protozoario, presenti nelle aree geografiche interessate.

Nei 13 animali in cui è stata effettuata la diagnosi in vita si è proceduto altresì alla 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), del fibrinogeno. Il profilo emocoagulativo è stato altresì completato dalla determinazione di antitrombina III (ATIII) e Proteina C (metodo cromogenico), D-dimero (metodo immunologico) ed infine Proteina S (metodo immunturbidimetrico). Allo scopo è stato utilizzato un sistema automatico ACL 9000 della Instrumentation Laboratory - USA. impiegando kit commerciali HemosIL™ (Instrumentation Laboratory Company- USA). In funzione del lotto di ogni kit, si è proceduto alla determinazione di una adeguata curva di calibrazione, impiegando un plasma di riferimento diluito in proporzioni scalari con soluzione fisiologica. Al fine di standardizzare le metodiche utilizzate sono stati inoltre processati 10 campioni di plasma provenienti da bovini poldolici sani, utilizzati come gruppo controllo, su cui sono state eseguite prove di sensibilità, di specificità, di ripetibilità (intra-assay), di riproducibilità (inter-assay) e di linearità.

Previa anestesia regionale e adeguato contenimento è stata effettuata la cistoscopia, impiegando un endoscopio rigido (Karl Storz - Germany), costituito da un sistema ottico con angolatura di 30°, di diametro di 4 mm, con camicia resettoscopica da 28

Ch e fonte luce fredda Xenon 300 w 6000°K. Al fine di favorire l'accesso in vescica e di migliorare la sua visione è stato impiegato rispettivamente uno speculum vaginale, che permetteva una corretta visualizzazione della plica uretrale, e la somministrazione di soluzione fisiologica attraverso il canale di servizio dello strumento; mediante l'ausilio di telecamera integrata (MonoCCD - obiettivo 25mm Karl Storz - Germany) le immagini cistoscopiche sono state visualizzate su un monitor e adeguatamente documentate in formato digitale. In sede di esame cistoscopico sono stati eseguiti almeno campionamenti biotici delle lesioni presenti; 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). I campioni ottenuti, sono stati prontamente conservati in differenti aliquote in azoto liquido ed in formalina al 10% tampone.

L'esame anatomopatologico ed istologico di tutti i campioni ottenuti è stata effettuato presso la sezione di Anatomia Patologica e Patologia Generale del Dipartimento di Patologia e Sanità animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli.

In seguito a macellazione tutte le vesciche degli animali malati sono state sottoposte ad esame macroscopico ed istopatologico allestendo sezioni di circa 4µm che sono state successivamente colorate con ematossilina eosina (H&E).

La diagnosi istologica è stata effettuata utilizzando la classificazione morfologica dei tumori uroteliali dell'uomo secondo quanto riportato dalla World Health Organization

(WHO) (2004) ed in accordo con quanto recentemente descritto in medicina veterinaria da Roperto e collaboratori (2007; 2009).

I campioni sottoposti a trattamento con azoto liquido e conservati a -80°C sono stati utilizzati per indagini molecolari al fine di identificare la eventuale presenza di DNA del papilloma virus tipo BPV-2. I campioni previo scongelamento sono stati omogeneizzati ed incubati “overnight” a 55°C con $60\ \mu\text{g}$ di proteinasi K ml^{-1} in appropriato tampone (Manos et al., 1989) e successivamente posti a 95°C per 10' per inattivare l'enzima. Ogni campione (10ml) è stato amplificato in 50 ml di mix di reazione contenente 3mM MgCl_2 , 1 U Platinum Taq (Invitrogen), 25 pmol di ogni primers e 200 mM dNTPs. La reazione è stata effettuata in termociclatore iCycler (Bio-Rad Laboratories) usando primers forward (59-TTGCTGCAATGCAACTGCTG-39) e reverse (59-TCATAGGCACTGGCACGTT-39) che amplificano un frammento di DNA compreso tra le regioni E5 ed L2 del BPV-1 (311 bp, from nt 3915 to 4226) e del BPV-2 (306 bp, from nt 3919 to 4225) (Otten et al., 1993). La PCR è stata eseguita in tal modo: denaturazione per 3 min a 95°C , seguita da 35 cicli di denaturazione a 95°C per 45”, quindi una fase di “annealing” a 50°C per 45” ed “extension” a 72°C per 1 min. I prodotti finali della PCR sono stati messi in elettroforesi con gel di agarosio al 2% agarose gel. A confermare i dati della PCR, la banda amplificata è stata tagliata dal gel e purificata attraverso membrane fornite dal QIAquick PCR quantification kit (Qiagen).

Quindi, il DNA amplificato è stato sottoposto a sequenziamento in appositi apparati (Biogen).

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica impiegando il test “t” di Student considerando significativi solo i risultati con valore di $p < 0,01$.

Risultati

In tutti gli animali arruolati, l'anamnesi remota rilevava la presenza di un'ematuria intermittente insorta non prima di uno-due anni dalla visita clinica. L'esame fisico diretto metteva in evidenza un dimagrimento con un body condition score compreso tra 1 e 2 associato, in taluni casi, ad ipotrofia delle muscolatura appendicolare e disidratazione moderata. Nella maggior parte degli animali l'esame del sensorio risultava nelle norma, al pari di quello dei linfonodi e della temperatura. L'esame della cute evidenziava talora ipoelasticità con mantello opaco e secco e moderata disidratazione. La valutazione delle mucose esplorabili rilevava in tutti gli animali un colorito compreso tra il grigiastro ed il bianco perlaceo, indice di un diverso grado di anemia. I soggetti maggiormente compromessi presentavano un incremento degli atti respiratori a riposo (30-35 atti/min) ed una lieve tachisfigmia (78-85 b/min). Per quanto attiene le grandi funzioni organiche, in soli due animali è stato possibile osservare episodi di disuria/stranguria. L'esplorazione rettale era nella maggior parte dei casi negativa solo in 5 animali era possibile palpare un ispessimento più o meno circoscritto della parete vescicale, associato talora ad algia seguita a minzione spontanea; l'urina si presentava di un colorito rossastro in alcuni casi associato alla presenza di micro-macrocoaguli. L'esame macroscopico delle stesse permetteva di evidenziare essenzialmente una macroematuria caratterizzata da un aspetto torbido (Vogel VI), pH (7-8), odore ematico e colore rosso

intenso legato alla presenza di numerosi globuli rossi (100-250 / μ l) evidenziati all'esame del sedimento, unitamente a diversi leucociti; era inoltre possibile osservare proteinuria (0,3 -5 g/L), emoglobina nonché cellule delle basse vie urinarie. Non erano presenti cilindri.

Nel 75% (36/48) degli animali malati è stata rilevata la presenza di anemia di tipo normocromico normocitica. 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 $2,24$ e $4,6 \times 10^9$ /l (range fisiologico: $5-10 \times 10^9$ /l) (Jain, 1986) nonché dell'ematocrito. Sette animali presentavano un'anemia normocitica ipocromica. In 21 soggetti era presente trombocitopenia (range $100-800 \times 10^9$ /l) mentre in 10 è stata rilevata leucopenia con valori limite di 2800×10^9 /l (range $4000-12000 \times 10^9$ /l); infine 12 soggetti mostravano una spiccata eosinofilia.

Le analisi ematochimiche hanno messo in evidenza negli animali oggetto del presente studio la presenza di: ipoproteinemia nel 23% (11/48) con valori compresi fra i 4 e 5,4 g/dl , di questi quattro animali presentavano ipoalbuminemia con valori rispettivamente di 1,63 - 1,10 g/dl. Una lieve iperazotemia è risultata presente nel 43.7% (21/48) mentre un aumento della GGT della GOT è stato riscontrato in due soli animali.

L'analisi PCR, convalidata dal sequenziamento diretto del DNA amplificato, ha dimostrato la presenza di autentiche sequenze di DNA del BPV-2; tali sequenze sono state identificate

in 36 dei 46 campioni di vescica (78% dei casi esaminati). Nessuno dei campioni analizzati ha mostrato la presenza di sequenze di BPV-1.

All'esame cistoscopico, eseguito in 13 animali, la mucosa vescicale si presentava edematosa, corrugata ed opaca, con colorito pallido e trama vascolare accentuata. In alcuni casi (8/13) erano inoltre presenti diffuse soffiusioni emorragiche associate alla presenza di fibrina e coaguli. L'esame cistoscopico permetteva, inoltre, la visione di lesioni proliferative con aspetto peduncolato e/o vegetante che tendevano a privilegiare la volta o le pareti laterali (3/13); in 9 animali era possibile osservare la presenza di placche circoscritte di colorito nerastro e/o rossastro delle dimensioni comprese tra 0,2 mm e i 3 cm. In un solo animale non era possibile osservare macroscopicamente alcuna modificazione ad eccezione del colorito tendente al bianco/grigiastro associato ad una accentuazione della trama vascolare.

L'esame biptico metteva in evidenza, in questi 13 animali, soprattutto carcinoma in situ (7/13), due displasie di cui una associata ad angioma a l'altra a carcinoma infiltrante di basso grado di invasività, tre carcinomi endoluminali e una forma sarcomatoide.

Considerando tutte le vesciche esaminate solo 6 (12,5%) presentavano all'esame macroscopico una mucosa fortemente ispessita, di cui una sola con neoformazioni di diverse dimensioni e di colore rosso scuro che coinvolgevano l'intero

organo. Tre animali non presentavano modificazioni macroscopicamente evidenti della vescica (Fig.6)

In circa il 48% (23/48) le vesciche presentavano una mucosa caratterizzata da aree delimitate ed ispessite o da proliferazioni piatte o bottoniformi, principalmente localizzate a livello di volta e pareti laterali dell'organo.

Nel 33.3% (16/48) era possibile osservare neoformazioni endoluminali di varie dimensioni, di colore rosso scuro di aspetto sessile o fungoide anch'esse localizzate preferibilmente a livello di corpo della vescica, alcune delle quali presentavano anche lesioni ulcerative e/o villose con base di impianto più o meno ampia.

Nel nostro campione la percentuale di neoplasie riscontrate istologicamente è stata del 93.75% (45/48). Nei restanti 3 animali è stata riscontrata una infiammazione diffusa della mucosa e due forme di cistite cistica associata a emorragie diffuse.

Come riportato nella tabella 2 la maggior parte delle neoplasie osservate era di origine epiteliale (44/48) un solo caso di esclusiva origine mesenchimale (rabdomioblastoma). La più frequente neoplasia è stata il CIS (presente in 32/48 dei casi esaminati) associato in 13 animali a neoplasie vascolari (emangiomi ed emangiosarcomi), a 5 carcinomi endoluminali ad alto grado, a 4 carcinomi endoluminali a basso grado ed, infine, 10 con carattere infiltrante. E' stato possibile rilevare, inoltre, un caso di carcinoma uroteliale contenente foci di metaplasia squamosa, 4 casi di carcinoma uroteliale con metaplasia

ghiandolare, 4 varianti nested ed, infine, una variante sarcomatoide. In un solo caso è stato diagnosticato un carcinoma uroteliale a crescita invertita associato ad un carcinoma infiltrante.

In un unico caso la vescica presentava un quadro di papillomatosi.

In molti di tali casi era inoltre possibile osservare quadri di displasia e/o aspetti di atipica reattiva.

In tutti i soggetti esaminati, non sono state riscontrate metastasi ai linfonodi regionali, sebbene sporadiche flogosi della capsula linfonodale e/o reattività aspecifica linfonodale sono state osservate in 3 animali.

Nelle tabelle n. 3 e 4, sono riassunti i valori medi e le deviazioni standard dei diversi parametri emocoagulativi studiati. Le prove di sensibilità, di specificità, di ripetibilità (intra-assay), di riproducibilità (inter-assay) e di linearità effettuate sono risultate pienamente soddisfacenti. In breve si è osservato un significativo aumento dell'attività dell'ATIII, della Proteina S ($p < 0,01$), della Proteina C e dei tassi plasmatici di Fibrinogeno ($p < 0,05$) rispetto a quanto rilevato nel gruppo di controllo. Il tempo di protrombina, quello di tromboplastina parziale attivata e il d-dimero non hanno mostrato significative variazioni. Per quanto attiene l'emostasi primaria 6 animali hanno presentato una moderata trombocitopenia con valori compresi tra 98 e 169 $\times 10^9/l$. Il tempo di emorragia e le prove di fragilità capillare sono risultate negative in tutti gli animali.

Discussioni

L'analisi dei risultati ottenuti in questo studio permette di fare innanzitutto delle considerazioni generali sulla ematuria enzootica del bovino.

Negli animali esaminati è stato possibile osservare che la malattia è sempre associata all'ingestione di felce, particolarmente ricca nelle aree geografiche in cui erano allevati i bovini. L'assenza di un'ematuria clinicamente non manifesta, osservata in 10 bovini, non deve essere sottovalutata dall'operatore aziendale e dal buiatra, per cui è buona norma nelle aree endemiche sottoporre tutti i bovini ad un rapido esame delle urine attraverso l'impiego di strisce reattive di campo che, nel presente studio, hanno confermato la loro buona sensibilità e specificità.

Va inoltre considerato che l'incidenza di tale affezione è favorita non solo dalla presenza infestante dello *Pteridium aquilinum*, ma anche dalla tipologia dell'allevamento che si caratterizza per la notevole presenza di animali a fine carriera con un'età spesso superiore ai 10 anni che vengono condotti per lunghi periodi di tempo in terreni infestati. E' inoltre opportuno effettuare una corretta diagnosi differenziale che deve tenere conto delle numerose malattie infettive e/o infestive legate al territorio da cui provengono gli animali.

Nella presente ricerca i rilievi clinici sono simili a quelli riportati da Hopkins e collaboratori (1986) e sono legati sicuramente all'evoluzione cronica dell'affezione e in particolare alla gravità dell'anemia presente. Infatti gli animali con maggior

coinvolgimento clinico presentavano un quadro di grave anemia con valori di emoglobina al disotto di 6 g/L.

L'anemia osservata nel 89,5% del campione è essenzialmente legata al carattere emorragico della malattia unitamente all'azione tossica della felce sul midollo che, come noto, causa una condizione di ipo-aplasia midollare (Evans et al., 1954; Hirono et al., 1984). Tale rilievo è confermato dalla presenza in alcuni animali di leucopenia, in accordo con quanto rilevato da altri autori (Hirono et al., 1984; Maxie e Newman, 2007). Il riscontro in 7 animali di un'anemia ipocromica, lascia ritenere che tale condizione sia legata ad un depauperamento cronico delle riserve organiche di ferro. Per quanto attiene l'eosinofilia osservata in 12 animali, essa potrebbe essere imputata ad infezioni subcliniche parassitarie o più verosimilmente al carattere cronico dell'affezione, rilievo riportato anche in altri studi. In particolare nell'uomo sono stati descritti quadri di cistite eosinofila accompagnati ad aumento di tali granulociti a livello ematico (Kilic et al., 2003).

Per quanto riguarda i risultati dell'esame ematobiochimico una particolare attenzione va posta nei confronti dell'iperazotemia riscontrata in 21 animali che può essere legata essenzialmente a infezioni subcliniche da *leptospira* spp o, più verosimilmente, a quadri progressivi di nefriti/pielonefriti ascendenti secondarie all'infezione vescicale. Il danno renale potrebbe costituire un aggravante nei confronti dell'anemia osservata e, nello stesso tempo, essere responsabile del quadro di

ipoalbuminemia rilevato in alcuni animali.

Nella presente tesi l'esame cistoscopico si è dimostrato il "gold standard" nello studio e nella caratterizzazione delle neoformazioni vescicali; esso permette una buona visualizzazione della mucosa dell'organo e consente già in vitam l'identificazione del tipo di lesione e il suo grado di diffusione. L'assenza di lesioni macroscopicamente evidenti deve indurre, comunque, l'operatore a sospettare forme occulte e pertanto è necessario eseguire biopsie estese sempre al fondo, al trigono e alle pareti della vescica, sebbene l'eventuale esito negativo dell'esame istologico non permetta di escludere del tutto la presenza di una condizione neoplastica.

La cistoscopia ha permesso inoltre di quantificare l'estensione delle lesioni permettendo così di formulare una corretta prognosi. A tal riguardo una diagnosi precoce è essenziale per poter stabilire il destino dell'animale e, nello stesso momento, permette di discriminare forme iniziali infiammatorie e/o pre-neoplastiche, che con una adeguata terapia medica o movimentazione degli animali potrebbero efficacemente regredire, incidendo positivamente sull'economia dell'intero allevamento.

Va comunque precisato che i limiti di tale tecnica diagnostica sono legati ai costi della strumentazione nonché dal suo utilizzo in campo in condizioni talvolta molto disagiati. Va inoltre segnalato che l'uso di tale metodica strumentale può essere applicata solo alle femmine precludendo, in tal modo, la diagnosi

nei maschi, su cui devono necessariamente essere applicate altre metodiche come l'ecografia transrettale.

Nel nostro studio, sulla base dei pattern di crescita delle lesioni tumorali e delle lesioni cosiddette 'simil-similtumorali' sono state identificate quattro differenti categorie di lesioni in accordo con quanto riportato da Roperto e collaboratori (2009): lesioni piatte, lesioni papillari o esofitiche, endofitiche ed invasive. I tumori di origine epiteliale erano presenti in 44/48 dei casi esaminati ed il carcinoma in situ (CIS) è risultato essere la lesione piatta più comune essendo presente nel 66,7% dei casi esaminati. Anche in medicina umana il Carcinoma *in situ* (CIS) risulta essere la neoplasia più comunemente riscontrata nell'ambito dei tumori vescicali con coinvolgimento degli ureteri distali dal 6 al 60% e l'uretra prostatica nel 26-67%. (Montironi, Lopez-Beltran, 2004 WHO Classification of Bladder Tumors, 2005). I tumori di origine mesenchimale costituiti per lo più da tumori vascolari costituivano circa il 27% dei casi presi in esame; essi erano costituiti soprattutto da angiomi ed emangiosarcomi; sono stati inoltre riportati sporadici casi di emangioendotelioma e di rabdomiosarcoma. Spesso i tumori di origine mesenchimale si accompagnavano a CIS (47,9%). I risultati da noi ottenuti circa la prevalenza di tumori epiteliali nei confronti dei mesenchimali sono sovrapponibili a quelli già noti in letteratura (Pamucku et al., 1976; Carvalho et al., 2006; Roperto et al., 2009).

Oltre alla tendenza da parte dei tumori epiteliali a prevalere sui tumori di origine mesenchimale, in genere, e come

confermato nel presente studio, nell'ambito della stessa vescica possono essere presenti tumori con istogenesi differente, in particolare, tumori epiteliali insieme a mesenchimali e con una presenza percentuale di più del 50% degli animali affetti.

L'atipia reattiva, lesione piatta uroteliale che nell'ambito dei nostri casi esaminati è risultata accompagnare CIS o foci di displasia, generalmente la si riscontra in presenza di infiammazione acuta o cronica o può coesistere come per i nostri casi, a displasia o a carcinoma in situ (CIS). In medicina Umana l'atipia reattiva, infatti è spesso associata a storia clinica di urolitiasi, cateterismi (Amin e Young, 1997), cioè in condizioni di flogosi croniche a livello vescicale; nel bovino affetto da ematuria enzootica cronica, i principi tossici della felce ad azione infiammatoria (braxina) possono giocare un ruolo importante a tale proposito (Yamada ed altri, 2007). Infatti, secondo Shahin e collaboratori (1998) la quantità e la durata di esposizione all'ingestione di felce gioca un ruolo cruciale nella gravità, nella natura delle lesioni che accompagnano l'ematuria enzootica bovina; si potrebbe supporre che lo sviluppo delle neoplasie vescicali dell'ematuria enzootica sia parte di un processo continuo che vede lesioni quali atipia, displasia e carcinoma in situ corrispondere forse a distinti, successivi stadi di uno stesso processo con la condizione borderline tra le diverse categorie di lesioni e qualche volta difficili da distinguere (Carvalho et al., 2006).

Non sono state rinvenute metastasi ai linfonodi regionali,

ma solo sporadiche flogosi della capsula linfonodale e/o reattività aspecifica linfonodale sono state osservate in 3 animali, anche se c'è da aggiungere che le neoplasie maligne a carico della vescica di animali affetti da EEC tendono a dare origine a metastasi a livello di linfonodi iliaci o ai polmoni (Jubb et al., 1993). Come già accennato, nel presente studio non abbiamo rinvenuto presenza di metastasi linfonodali. Da indagini effettuate in Italia meridionale e su un campione statisticamente significativo (circa 400 casi esaminati) l'incidenza di eventi metastatici oscilla comunque intorno all'8-10% (Roperto et al., 2009). Va comunque precisato che le diversità nei risultati istologici potrebbero essere attribuiti alle diverse dimensioni del campione preso in esame, alle specie di felce distribuite in diverse aree geografiche, dalla stadiazione della malattia, ecc.

Per quanto attiene le indagini molecolari, l'analisi PCR, convalidata dal sequenziamento diretto del DNA amplificato, ha dimostrato la presenza di autentiche sequenze di DNA del BPV-2 che sono state identificate nel 78% dei casi esaminati. Recenti studi (Roperto et al., 2008) hanno permesso di evidenziare la presenza di BPV-2 DNA nel sangue (in particolare la presenza della proteina virale E5 è stata identificata a livello di cellule linfocitarie) ed a livello di lesioni neoplastiche di un gran numero di bovini affetti da EEC; tale simultanea presenza di DNA di BPV-2 nel sangue e nei tumori vescicali suggerisce che il virus non solo potrebbe raggiungere l'urotelio vescicale attraverso la via paragenitale (Campo, 2002) ma rimanere allo stato attivo nel

circolo ematico, in particolare nei linfociti, come reservoir di infezione virale ed in presenza dei co-carcinogeni può causare sviluppo di neoplasie vescicali (Roperto et al., 2008). Anche il DNA di papillomavirus umano (HPV) è stato identificato nelle cellule del sangue di persone sane e pazienti pediatriche, suggerendo che tali cellule possano costituire una riserva di HPV nell'infezione delle cellule epiteliali (Bodaghi et al., 2005).

Come già accennato in premessa, negli animali con ematuria cronica è possibile osservare turbe emocoagulative che si esprimono clinicamente con una trombocitopenia e con la presenza di micro-macrocoaguli (Maxie e Newman, 2007). Anche nel nostro studio il rilievo di una trombocitopenia unitamente alle modificazioni di alcuni test della coagulazione lascia ipotizzare che esistano turbe emocoagulative compensate. Per quanto attiene l'emostasi primaria nonostante la presenza di trombocitopenia le indagini collaterali dirette non hanno messo in evidenza particolari anomalie indicando, in tal modo, una sufficiente capacità aggregante piastrinica.

In medicina umana anomalie della funzione emocoagulativa sono presenti nel 50% dei pazienti con cancro e nel 95% di quelli che presentano forme metastatiche (Iqbal 2000). Nei pazienti oncologici si assiste frequentemente ad un'attivazione sub-clinica dei sistemi coagulativi e di fibrinolisi (Zacharsky et al., 1992); tale attivazione è in grado, quindi, di influenzare l'evoluzione dei processi neoplastici attraverso sia un'azione procoagulante che fibrinolitica.

I risultati da noi ottenuti mostrano un incremento significativo delle attività di ATIII, Protein C e della Proteina S in grado di poter agire sull'equilibrio della bilancia emostatica favorendo un'azione anticoagulante che potrebbe essere considerata come un fattore "protettivo" nei confronti dell'evoluzione della condizione neoplastica. Risultati simili sono stati riportati da Zietek e collaboratori (1997) e da Iwan-Zietek e collaboratori (1997) in pazienti umani affetti da carcinoma della vescica.

E' stato dimostrato che l'attività procoagulante è legata all'angiogenesi e la crescita tumorale attraverso l'azione della trombina, e successivamente della fibrina che tende a disporsi alla periferia della lesione neoplastica garantendo, in tal modo, una protezione "meccanica"; al contrario un'azione fibrinolitica sembrerebbe invece essere in grado di favorire la metastatizzazione e la progressione locale del tumore (Nemerson 1992; Costantini and Zacharski 1993). Nel 1999 Hejna e collaboratori hanno posto la loro attenzione sugli effetti protettivi dello stato di ipocoagulabilità in corso di neoplasie maligne; tali autori sono stati, infatti, in grado di dimostrare come tale condizione fosse in grado di ridurre nei pazienti oncologici i fenomeni di metastatizzazione. In corso di ematuria enzoetica la possibilità che si verificano condizioni di metastasi è, come detto, alquanto limitata (Roperto et al., 2009). Nel nostro studio si osserva una condizione di ipocoagulabilità associata all'assenza di forme metastatiche; tale stato si potrebbe estrinsecare attraverso l'azione inibitoria dell'ATIII nei confronti

della trombina, le cui concentrazioni sono, nell'uomo, direttamente proporzionali al grado di metastatizzazione dei tumori (Nierodzik, 1991). Anche il rilievo di elevate concentrazioni di Proteina C e Proteina S osservate nel nostro campione, potrebbe influenzare negativamente i livelli plasmatici della trombina, attraverso il legame trombomodulina-trombina.

Va inoltre rilevato che l'attività coagulativa può essere influenzata anche dalla presenza di sostanze con attività antirombinica contenute nei vegetali. Lo stesso *Pteridium aquilinum* sembra avere una certa attività anti coagulante, marcatamente presente in altre specie vegetali quali l'*Hedera helix*, la *Festuca jubata* e il *Laurus* che vivono alle stesse latitudini della felce (de Medeiros et al., 2000).

Non è da escludere che l'attività anti coagulante potrebbe inoltre essere legata anche al tipo di neoplasia presente: diversi autori hanno riportato una produzione di ATIII da parte di cellule neoplastiche in pazienti umani affetti da carcinoma epatico (Akiyama et al., 1993; Iguchi et al., 1996).

Per quanto attiene, infine, le concentrazioni più elevate di fibrinogeno osservate nel nostro campione va precisato che tale incremento è stato riportato anche in corso di alcune neoplasie maligne dell'uomo (Dvorak 1987). In particolare nei tumori gastrici è stata riportata una correlazione fra le dimensioni, il grado di infiltrazione della neoplasia e l'iperfibrinogemia (Lee et al., 2004). Va comunque precisato che, nel nostro caso, l'incremento di tale parametro potrebbe essere legato alla

condizione infiammatoria locale come riportato anche in campo umano.

In conclusione tale studio ha messo in evidenza l'importanza della cistoscopia, non solo ai fini di una diagnosi precoce ma soprattutto per la definizione di una corretta prognosi finalizzata all'economia dell'allevamento. Ulteriori ricerche sono comunque auspicabili per meglio definire il ruolo delle modificazioni emocoagulative sul processo cancerogenico locale anche attraverso l'impiego di nuovi test diagnostici quali la trombomodulina e il fattore tissutale. Va infine considerato che bovini affetti da EEC rappresentano un valido modello per la comprensione della potenziale oncogenicità della felce e dei suoi costituenti chimici e, quindi, un importante strumento per lo studio della carcinogenesi ambientale.



Fig. 1 – Pteridium Aquilinum

Fig. 2 – Pteridium Aquilinum
Estesa e fitta copertura della pianta.





Fig. 3 – Pteridium Aquilinum.
Particolare di fronda di profilo triangolare

Fig. 4 – Pteridium Esculentum





Fig. 5 - Pteridium Aquilinum.
La pianta come si presenta nel periodo autunnale.

Fig. 6 – Vescica bovina.
Aspetto macroscopico normale e senza presenza di lesioni.



Foto gentilmente concessa dal Prof. Roberto F. - Dipartimento di Patologia e Sanità Animale - Sez. Anatomia Patologica - Università degli Studi di Napoli Federico II - Facoltà di Medicina Veterinaria

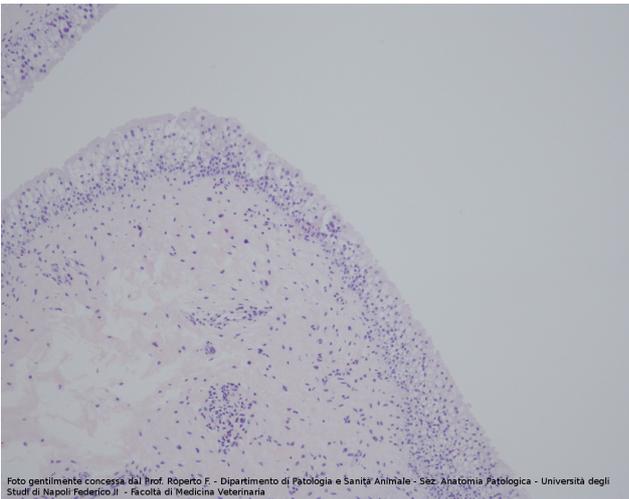


Foto gentilmente concessa dal Prof. Roberto F. - Dipartimento di Patologia e Sanità Animale - Sez. Anatomia Patologica - Università degli Studi di Napoli Federico II - Facoltà di Medicina Veterinaria

Fig. 7 – Vescica bovina.
Urotelio normale

Fig. 8 – Vescica bovina
Atipia Reattiva.

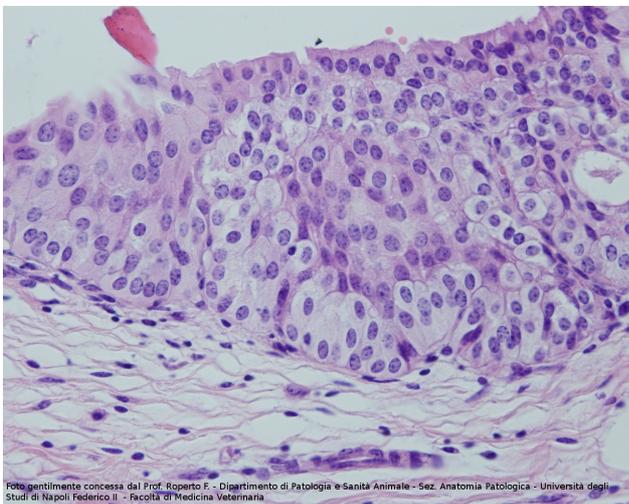
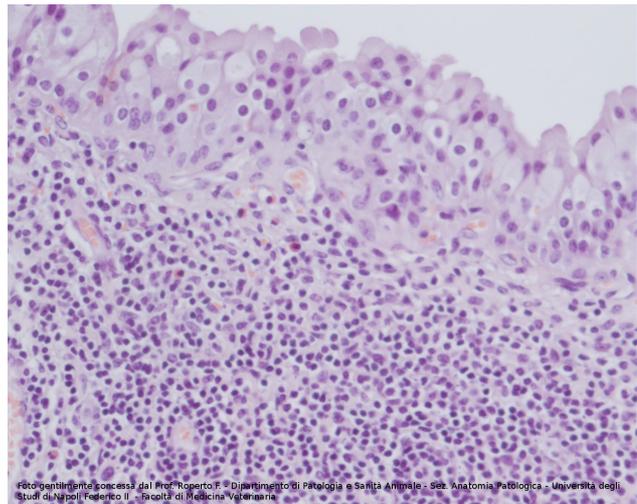
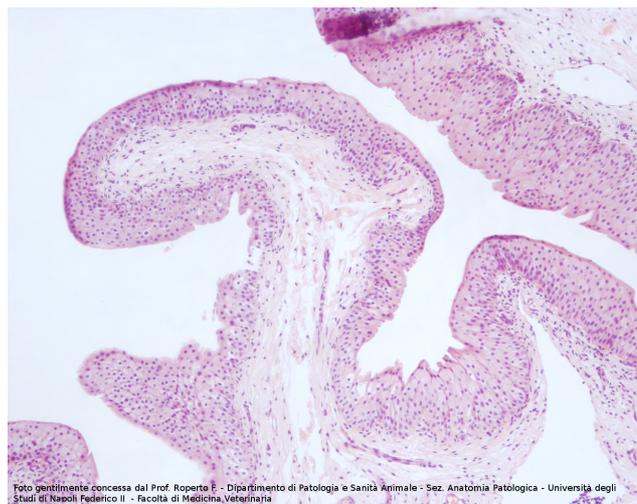


Fig. 9 – Vescica Bovina
Displasia Uroteliale.

Fig. 10 – Vescica Bovina
Papilloma



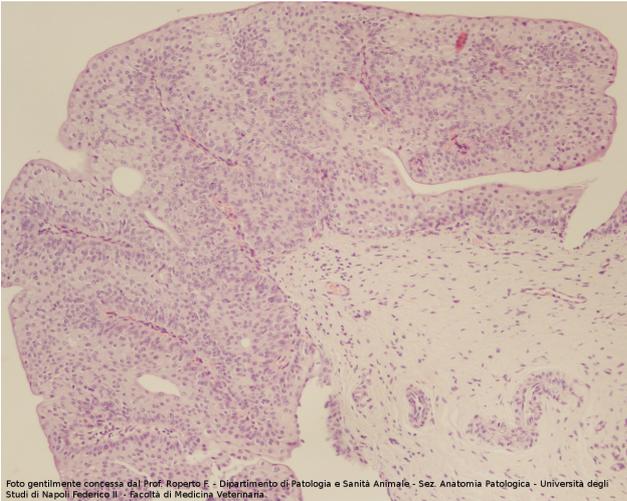


Fig. 11 – Vescica Bovina
PUNLMP (Neoplasia uroteliale a basso
potenziale di malignità).

Foto gentilmente concessa dal Prof. Roberto F. - Dipartimento di Patologia e Sanità Animale - Sez. Anatomia Patologica - Università degli Studi di Napoli Federico II - Facoltà di Medicina Veterinaria.

Fig. 12 – Vescica Bovina
Carcinoma *in situ*

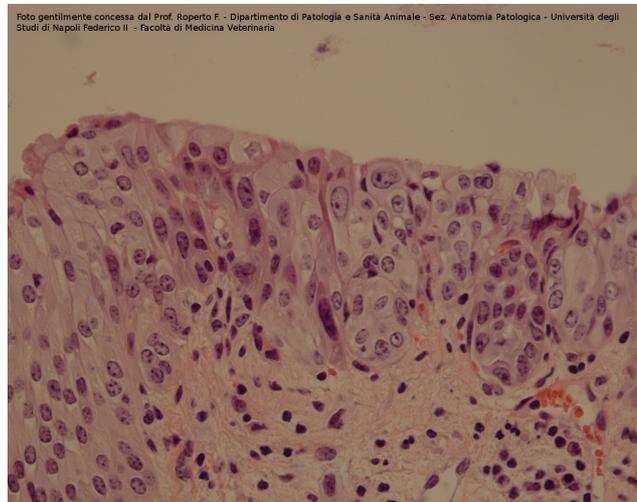


Foto gentilmente concessa dal Prof. Roberto F. - Dipartimento di Patologia e Sanità Animale - Sez. Anatomia Patologica - Università degli Studi di Napoli Federico II - Facoltà di Medicina Veterinaria.

Tab.2**Risultati istologici delle lesioni neoplastiche e non in 48 bovini affetti da EEC**

<u>Tumori epiteliali</u>	44
<u>Benigni (papilloma)</u>	1
<u>Maligni (CIS)</u>	32
-in associazione a Ca endopapillari AG	(5)
-in associazione a Ca endoluminale BG	(4)
-in associazione a tumori vascolari	(13)
-in associazione a neoplasie infiltranti	(10)
<u>Carcinoma a crescita invertita</u>	1
 <u>Varianti istologiche</u>	
Carcinoma con foci di metaplasia ghiandolare	4 (1 caso associato a tumore vascolare)
Carcinoma con foci di metaplasia squamosa	1
Variante nested carcinoma	4
Variante carcinoma sarcomatoide	1

<u>Tumori mesenchimali</u>	
<u>Tumori vascolari</u>	
-in associazione a CIS	(10)
-in associazione a metaplasia ghiandolare	(1)
<u>Rabdomioblastoma</u>	1

<u>Lesione simil-neoplastiche</u>	
Cistite cistica	2

<u>Flogosi</u>	1
-----------------------	----------

Totale del numero delle vesciche esaminate	48
---	-----------

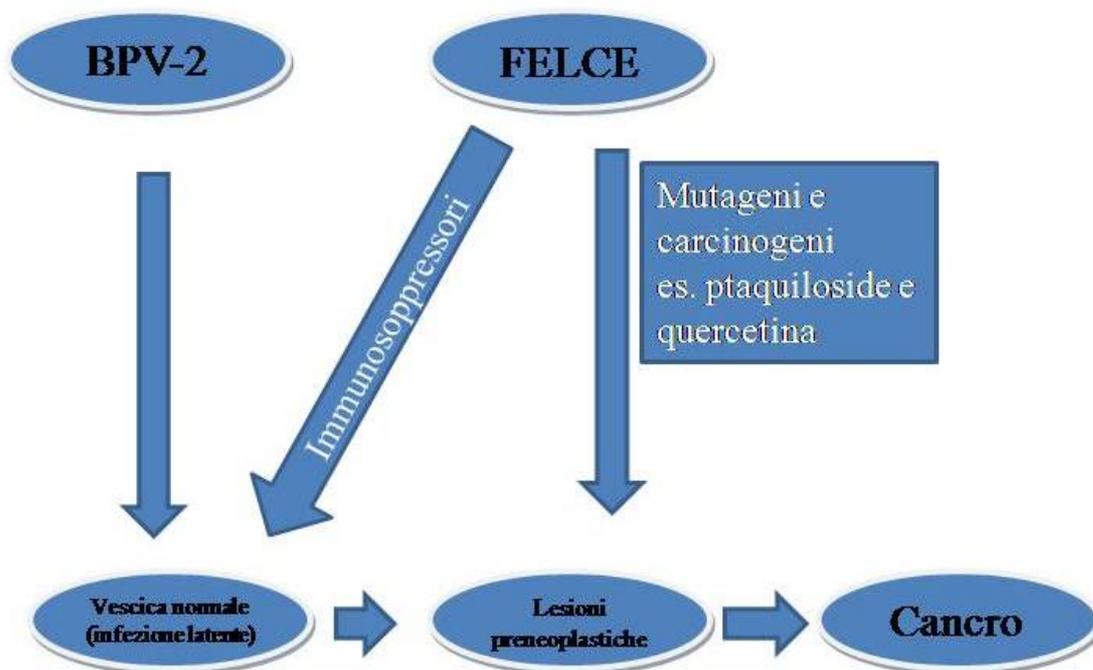
Tabella n. 3 - Valori dei parametri emocoagulativi nei soggetti sani e in quelli affetti da ematuria enzootica cronica (EEC)

SOGGETTI SANI	R-PT (s)	APTT (s)	FIB-CL (mg/dl)	AT III (%)	PC (%)	PS (%)	D-Dimero (ng/ml)
1	18,5	54,6	136	105	27,8	127	362
2	22,5	48,1	134	71,9	23,1	130,8	573
3	18,4	37,3	121	83,6	31,2	144,9	767
4	20,0	44,8	203	90,9	24,5	133	308
5	20,1	54,7	133	87,1	20,5	113	139
6	20,2	53,4	155	90,2	21,7	111	151
7	17,6	40,4	258	108	27,9	115	739
8	18,0	44,0	289	113	26,9	114	709
9	19,0	45,4	275	106	26,8	107	699
10	28,8	45,6	167	92,5	29,4	78,5	217
11	25,3	42,0	213	117	23,6	113	284
12	23,3	57,5	190	103	23	114	290
	21,0	47,3	189,5	97,4	25,5	116,8	436,5
	3,40	6,39	58,90	13,38	3,28	16,50	242,62

Tabella n. 4

SOGGETTI AF-FETTI DA EEC	R-PT (s)	APTT (s)	FIB-CL (mg/dl)	AT III (%)	PC (%)	PS (%)	D-Dimero (ng/ml)
13	14,6	30,10	275	138	32	299,7	780
14	15,3	35,10	305	155	48,1	190,8	272
15	21,7	87,9	226	93,8	36,4	197,7	604
16	16,0	61,9	275	119	29,8	248,7	356
17	13,8	42,3	209	155	51	214,8	161
18	15,2	27,7	141	155	43,4	225,3	288
19	17,1	41,2	425	143	33,2	198,3	337
20	19,1	38,2	328	132	36,8	225,6	446
21	18,8	41,4	305	106	26,7	230,4	770
22	21	23,4	423	154	38,4	222,5	360
23	26,5	28,2	430	130	39,4	190,6	540
24	24	24,6	523	113	45,3	292,5	680
25	16	20,3	390	142	23,5	195,6	208
	18,39	38,64	327,31*	133,52*	37,23*	225,58*	446,31
	3,92	18,43	106,81	20,35	8,25	35,95	209,28

*p<0,01



Schema rappresentante la relazione tra il papilloma virus BPV-2 e la felce nella eziopatogenesi dei tumori vescicali del bovino in corso di ematuria enzootica cronica. Campo et al, 1992; Prakash et al, 1996; Borzacchiello et al, 2001, Borzacchiello et al, 2003.

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. J., 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 hemostasis associated with malignancy: etiology, pathophysiology, diagnosis and management. Semin Thromb Hemost 5:1-26,1978.

Bjieldanes 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., AmbrosioV., 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

Buccheri G., Torchio P., Ferrigno D., Plasma levels of D-dimer in lung carcinoma: clinical and prognostic significance. *Cancer* 2003; 97:3044-52

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, *Virology*, 170 1989: 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 "128th SGM Symposium- Viruses and Cancer ", A.C. Minson Editor, Cambridge University 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: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91:3527 – 3561, 1998

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* 75:329-336, 1990.

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 Med* 98: 917-928, 1981.

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.

Francis JL, Biggerstaff J, Amirkhosravi A.: Hemostasis and Malignancy. Semin Thromb Hemost 24:93-109, 1998.

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.

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.

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.* **115**:375-378, 1984

Honn KV, Tang DG, Crissman JD: Platelets and cancer metastasis: a casual relationship? *Cancer Metastasis Rev* 11:325-351, 1992.

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. 20-24th 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., (2000) Role of thrombomodulin in cancer biology The Breast 9, 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, 4th 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 papillomavirus, *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.

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

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)*, 2nd 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.

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. In: *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, Sesterhenn 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.

Osweiler 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.

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.

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*, 8th edition. Baillière Tindall, 1559-1562.

Raghavan D, Shipley WU, Garnick MB, Russell PJ, Richie JP, (1990) Biology and management of bladder cancer. *N Engl J Med* 322:1129-1138

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., Hemostatic 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.

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., Smith B.L., Worrall S., Moore M.R., Seawright A.A., Prakash A.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 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.

Slungaard A., Vercellotti GM, Tran T, Gleich GJ, Key NS, Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function. A potential mechanism for thromboembolism in hyperesoniphilic 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.

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.

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.

Watson W.A., Barnett K.C., Terlecki S., Vet. Rec., 1965; 77: 1060-1069.

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 , Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycoside: chemistry, biology and ecology, Natural Product Reports, 2007; 24: 798-813.

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