



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO di SANITA' PUBBLICA e PATOLOGIA COMPARATA
CICLO XX

**IPERPLASIA PROSTATICA E URETRALE IN VITELLI
TRATTATI CON ORMONI STEROIDEI SESSUALI:
STUDIO SUL SIGNIFICATO PATOGENETICO DELLE
CELLULE NEUROENDOCRINE E DELL'INTERAZIONE
STROMA-EPITELIO**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Marco Martini

Supervisore: Ch.ma D.ssa Lisa Poppi

Dottorando: Marta Orazi

31 gennaio 2008

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
Capitolo 1	
RIFERIMENTI NORMATIVI	pag. 4
1.1 <i>Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158</i>	pag. 4
1.2 PIANO NAZIONALE RESIDUI	pag. 7
Capitolo 2	
IL BOVINO E I TRATTAMENTI ILLECITI	pag. 14
2.1 IL COMPLESSO URETRO PROSTATICO	pag. 14
2.2 SOSTANZE IMPLICATE E LESIONI RICONDUCEBILI A TRATTAMENTO	pag. 15
Capitolo 3	
L'IPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA NELL'UOMO	pag. 19
3.1 LA PROSTATA	pag. 19
3.2 L'IPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA	pag. 20
Capitolo 4	
LE CELLULE NEUROENDOCRINE	pag. 22
4.1 L'UOMO	pag. 22
4.2 IL BOVINO	pag. 24
Capitolo 5	
L'INTERAZIONE STROMA-EPITELIO	pag. 26
Capitolo 6	
MATERIALI E METODI	pag. 31
6.1 SCELTA DEL CAMPIONE	pag. 31
6.2 METODICHE APPLICATE	pag. 32

6.2.1 Istochimica	pag. 32
6.2.2 Immunoistochimica	pag. 33

Capitolo 7

RISULTATI	pag. 38
7.1 ISTOCHIMICA	pag. 38
7.2 IMMUNOISTOCHIMICA	pag. 40
7.2.1 Cellule neuroendocrine	pag. 40
7.2.2 Interazione stroma-epitelio	pag. 43
7.2.2.1 FGF-7 e IL-1 α	pag. 43
7.2.2.2 FGF-2 e IL-8	pag. 43
7.2.2.3 FGF-R	pag. 47

Capitolo 8

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 49
--	---------

Capitolo 9

BIBLIOGRAFIA	pag. 59
---------------------------	---------

SUMMARY

In beef-breeding, illegal administration of sex steroid hormones with anabolic purposes is suspected as a still diffuse practice in many European countries. The continuous evolution in strategies of treatment has determined an attenuation or the disappearance of the classical *ante mortem* and macroscopic lesions on animals. Histopathological evaluation of bovine prostate and urethra, considered as the target organs of estrogenic and androgenic hormones, has proved to be an important method to detect the use of anabolics in bovine production with preventive implications. Typical histological lesions following to steroid hormones administration are urethral and prostatic hyperplasia and squamous metaplasia, with variable severity and distribution in relation to the specific hormone or hormones cocktail administered.

In human prostate, role of neuroendocrine (NE) cells and stromal-epithelial interaction in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia has been extensively analyzed.

In this study, immunoreactivity to Serotonin and Chromogranin A, considered as typical markers of NE cell, to fibroblast growth factors (FGF-2 and -7) and interleukins (IL-8 and -1 α) has been evaluated on specimens of urethro-prostatic complex collected from experimentally hormones treated veal calves; moreover, it has been considered the expression of fibroblast growth factors receptors (FGF-R).

Urethral Serotonin-positive NE cells have showed to be sensitive to hormonal treatment. Also concerning stromal-epithelial interaction, prostatic expression of FGF-2, IL-8 and FGF-R has revealed a significant correlation to administration of steroid hormones. No data have been obtained about interaction between FGF-7 and IL-1 α .

In conclusion, this study confirm the involvement of NE cells and stromal-epithelial interaction on the pathogenesis of bovine hormones induced prostatic and urethral hyperplasia, suggesting some important implication in evaluation of lesions in suspected treated animals.

RIASSUNTO

Nell'allevamento del bovino da carne, la somministrazione di steroidi sessuali a scopo anabolizzante si sospetta essere una pratica tuttora largamente diffusa in molti Paesi europei. L'evoluzione nelle strategie di trattamento cui si è assistito dagli anni '80 ad oggi ha reso però progressivamente più difficile l'individuazione delle classiche alterazioni che consentissero di riconoscere gli animali trattati, sia in vita che dopo la macellazione, determinando inoltre l'attenuazione o la scomparsa anche dei tipici quadri istopatologici osservati a livello del complesso uretro-prostatico bovino, individuato come specifico organo bersaglio degli ormoni steroidei.

La lesione che ha continuato a presentarsi in modo costante a carico dell'epitelio sia prostatico che uretrale, seppure a gravità variabile e spesso in luogo delle più conclamate lesioni di metaplasia squamosa, è stata l'iperplasia/ipertrofia degli stessi epitelii.

Con lo scopo di approfondire il significato delle lesioni iperplastiche a livello prostatico ed uretrale, si è fatto perciò riferimento ai numerosi studi condotti in medicina umana, che hanno estensivamente analizzato il significato della differenziazione neuroendocrina e dell'interazione stroma-epitelio nella patogenesi dell'ipertrofia/ipertrofia prostatica benigna.

E' stata quindi valutata l'immunoreattività delle cellule neuroendocrine (NE) a Serotonina e Cromogranina A: le cellule NE positive alla Serotonina sono risultate essere, quantomeno a livello uretrale, sensibili ai trattamenti ormonali e coinvolte, anche nel bovino, nello sviluppo dell'iperplasia.

Relativamente al possibile ruolo dell'interazione stroma-epitelio nella patogenesi delle lesioni prostatiche ed uretrali indotte da trattamento ormonale, è stata valutata l'espressione epiteliale e stromale, nonché l'eventuale interazione tra loro, dei fattori di

crescita fibroblastica (FGF-2 e -7) e delle interleuchine (IL-8 e -1 α); è stata inoltre considerata l'espressione recettoriale per i fattori di crescita fibroblastica.

I risultati ottenuti hanno permesso di confermare, in questo caso a livello ghiandolare, il *loop* paracrino tra FGF-2 ed IL-8, mentre i dati relativi all'interazione tra FGF-7 ed IL-1 α non sono risultati attendibili; anche per i recettori dei fattori di crescita fibroblastica è stata evidenziata un'influenza significativa degli ormoni steroidei sessuali sulla loro espressione.

Concludendo, lo studio condotto ha confermato il coinvolgimento delle cellule NE e dell'interazione stroma-epitelio nella patogenesi dell'iperplasia prostatica ed uretrale bovina indotta da trattamento ormonale, fornendo nuove possibili indicazioni per l'interpretazione delle lesioni istologiche osservate negli animali sospetti di trattamento.

INTRODUZIONE

Il sospetto che nell'allevamento del bovino da carne continui a verificarsi, nonostante vietata per legge, la somministrazione di sostanze ormonali a scopo anabolizzante ha portato ad intraprendere percorsi di ricerca orientati all'identificazione di biomarcatori indiretti di trattamenti illeciti, che potessero essere di supporto e di riferimento nell'individuazione degli animali trattati.

L'evidenza che i trattamenti illeciti abbiano subito negli anni continue evoluzioni, con la conseguente scomparsa delle classiche alterazioni osservabili all'esame *ante mortem* ed alla valutazione anatomo-patologica *post mortem* ^(1,2,3,4,5,6), spesso associata alla difficoltà nel rilevare i residui delle sostanze somministrate nei liquidi biologici degli animali, ha riportato l'attenzione sull'esame istopatologico quale metodo di *screening* in grado di individuare quelle lesioni che, al di là del tempo intercorso tra trattamento e macellazione, fossero comunque rilevabili e strettamente riconducibili alla somministrazione di ormoni steroidei sessuali, anche quando variamente combinati tra loro ^(5,7,8,9).

Tra gli organi principalmente significativi in tal senso, la prostata e l'annessa uretra pelvica sicuramente rivestono un ruolo di rilievo: su di esse l'azione estrogenica si manifesta tipicamente con iperplasia e metaplasia squamosa a carico degli epitelii, mentre gli androgeni, pur mantenendo un effetto iperplastico sugli stessi, determinano primariamente dilatazione tubulare ed ipersecrezione a livello ghiandolare, con possibile formazione di cisti o microcisti ^(5,7,8,9,10).

Attraverso la valutazione quotidiana di campioni provenienti dall'attività veterinaria di controllo della qualità per aziende private o nell'ambito di piani di monitoraggio regionale, e facendo stretto riferimento ai dati derivanti dalla somministrazione sperimentale di ormoni steroidei sessuali, anche a livello istopatologico è diventata però sempre più frequente l'osservazione di quadri lievemente diversi, o comunque

attenuati, rispetto a quelli classicamente rilevati. E' diventata inoltre progressivamente più evidente la marcata diversità di comportamento tra prostata ed uretra in risposta ai trattamenti ormonali, a sua volta come probabile esito del modificarsi delle strategie di trattamento e della somministrazione di sostanze diverse o comunque diversamente associate tra loro.

La lesione che in modo costante, seppure a gravità variabile, ha continuato a presentarsi a carico sia della prostata che dell'uretra è l'iperplasia/ipertrofia degli epitelii, in luogo delle più conclamate lesioni di tipo metaplastico. Partendo da tale osservazione, si è voluto dunque indagare sul meccanismo patogenetico alla base dello sviluppo dell'iperplasia prostatica ed uretrale con lo scopo di poterne meglio interpretare il significato negli animali sospetti di trattamento. A tal fine, si è fatto riferimento ai numerosi studi condotti nell'uomo, nel quale l'iperplasia prostatica benigna (BPH) rappresenta a tutt'oggi uno tra i più frequenti disturbi proliferativi, ma la cui conoscenza sulla sua patogenesi non è ancora del tutto completa (11,12,13,14). In particolare, le ricerche effettuate in medicina umana hanno estensivamente analizzato il significato ed il ruolo delle cellule neuroendocrine (NE) e dell'interazione stroma-epitelio come possibili fattori alla base dello sviluppo della BPH (11,12,15,16,17,18). Per entrambi è stato confermato un coinvolgimento nella proliferazione epiteliale, con conseguenti implicazioni anche nella BPH (11,14,15,17,18,23). Sebbene nell'uomo essa non sia esclusivamente correlata ad uno squilibrio ormonale o comunque ad un'azione diretta di androgeni ed estrogeni, il bovino presenta diverse similarità con l'uomo, *in primis* la presenza di un elevato numero di cellule NE sia a livello prostatico che uretrale (24,25).

I protocolli di ricerca utilizzati nell'uomo sono stati quindi applicati nel bovino, considerando l'ipotesi che le cellule NE, così come l'interazione tra stroma ed epitelio, potessero essere effettivamente coinvolte nello sviluppo dell'iperplasia uretroprostatica bovina e che tali fattori potessero quindi rappresentare un ausilio, il più

possibile attuale ed applicabile a quanto rilevato sul campo, nella valutazione delle lesioni indotte da trattamento ormonale.

Capitolo 1

RIFERIMENTI NORMATIVI

1.1 DECRETO LEGISLATIVO 16 MARZO 2006, N. 158

Il Decreto Legislativo 158/2006, entrato in vigore nell'aprile dello stesso anno, ha abrogato il precedente Decreto Legislativo 336/1999 nonché la Legge 4/1961, che regolamentavano il divieto di utilizzo di sostanze ad azione ormonale nelle produzioni animali ed indicavano le misure di controllo da adottare negli animali vivi e nei loro prodotti. Le disposizioni del nuovo Decreto per lo più non si discostano da quelle del precedente, ma introducono comunque alcuni aspetti nuovi di seguito riportati.

Divieto di somministrazione. Il Decreto 156/2006 ribadisce l'assoluto divieto di somministrazione a tutte le specie animali di tireostatici, stilbeni e loro derivati, sali ed esteri. Stabilisce inoltre che è vietato somministrare agli animali, le cui carni e prodotti siano destinati al consumo umano, estradiolo-17 β e derivati, nonché sostanze β -agoniste (art. 2). L'art. 3 dispone il divieto di somministrazione ad animali di allevamento e di acquacoltura delle sostanze sopra indicate e di quelle ad azione estrogena, androgena e gestagena, nonché l'immissione sul mercato di carni e prodotti carnei provenienti da animali a cui siano state somministrate le suddette sostanze.

Deroghe al divieto di somministrazione. L'art. 4 prevede alcune deroghe rispetto al divieto generale di cui agli artt. 2 e 3. A scopo terapeutico è infatti consentito somministrare a singoli animali di un'azienda testosterone, progesterone o derivati: la somministrazione può essere effettuata solamente da un veterinario mediante iniezione o mediante spirale vaginale per il trattamento di una disfunzione ovarica, ma non mediante impianti; sostanze β -agoniste e trenbolone-allilico possono essere somministrati per via orale unicamente agli equidi o ad altri animali da compagnia. Le

sostanze β -agoniste possono essere somministrate alle vacche al momento del parto sotto forma di iniezione per l'induzione della tocolisi. Mentre il trattamento degli equidi e degli animali da compagnia con le sostanze di cui sopra è sufficiente che avvenga sotto la diretta responsabilità del veterinario (può infatti essere svolto anche dal detentore sotto la responsabilità del veterinario), qualora il trattamento riguardi animali della specie bovina lo stesso deve essere effettuato direttamente dal veterinario medesimo; estradiolo-17 β e suoi derivati possono essere somministrati unicamente da un veterinario ai fini del trattamento di mummificazione/macerazione fetale dei bovini o della piometra dei bovini. Si precisa inoltre che il trattamento terapeutico con le sostanze sopra indicate è comunque vietato nel caso di animali destinati alla produzione di carne e latte. Fa eccezione la somministrazione di sostanze β -agoniste alle vacche al momento del parto sotto forma di iniezione per l'induzione della tocolisi. E' altresì vietata la somministrazione delle suddette sostanze ad animali da riproduzione a fine carriera. L'art. 5 regola il trattamento zootecnico, i trattamenti a scopo di inversione sessuale in acquacoltura, nonché i trattamenti finalizzati all'induzione dell'estro in alcune specie animali. Ai fini zootecnici è consentita al veterinario la somministrazione di medicinali veterinari contenenti sostanze ad azione estrogena diverse dall'estradiolo-17 β e ad azione androgena o gestagena. La somministrazione a bovini, equini, ovini e caprini d'azienda di medicinali veterinari contenenti estradiolo-17 β o i suoi derivati ai fini dell'induzione dell'estro era consentita fino al 14 ottobre 2006 (comma 1, lettera c). E' in ogni caso vietato il trattamento zootecnico di animali destinati alla produzione di carne e di latte. Lo stesso divieto vige per gli animali da riproduzione a fine carriera durante il periodo di ingrasso (comma 3).

Registro. Ai sensi dell'art. 4, comma 3 il veterinario curante è tenuto a registrare i trattamenti eseguiti in un registro vidimato dal Servizio Veterinario dell'Azienda

Sanitaria territorialmente competente. Questo registro deve essere conservato in azienda, unitamente alle ricette veterinarie, per almeno 5 anni.

Ricetta. L'art. 5, comma 2, dispone che il veterinario, nei casi previsti al comma 1 dello stesso articolo, debba compilare una ricetta in triplice copia non ripetibile, in cui sia indicato con esattezza sia il trattamento zootecnico previsto che la quantità di prodotto necessario. Il veterinario è tenuto altresì ad annotare i medicinali prescritti nel registro di cui all'art. 4, comma 3.

Comunicazione dei trattamenti all'Azienda Sanitaria. I trattamenti devono essere comunicati entro tre giorni dal veterinario che li effettua al Servizio Veterinario dell'Azienda Sanitaria territorialmente competente. Tale comunicazione deve riportare l'ubicazione dell'azienda, i dati del detentore degli animali trattati, nonché il tipo di medicinale veterinario utilizzato ed il relativo tempo di sospensione, la data ed il tipo di intervento eseguito (art. 5, comma 4).

Divieto immissione in commercio. Le sostanze ormonali che agiscono mediante un effetto deposito, oppure il cui tempo di sospensione è superiore a 15 giorni, non possono essere commercializzate. Lo stesso vale per le sostanze β -agoniste il cui tempo di sospensione è superiore a 28 giorni dopo la fine del trattamento (art. 6).

Autocontrollo. Il responsabile dello stabilimento di macellazione e di prima trasformazione dei prodotti di origine animale deve adottare un piano di autocontrollo finalizzato a garantire che vengano accettati soltanto animali per i quali l'allevatore abbia assicurato il rispetto dei tempi di sospensione. Il responsabile di cui sopra deve altresì assicurarsi che gli animali da ingrasso o i prodotti di origine animale introdotti nello stabilimento non contengano residui superiori ai limiti massimi consentiti e non presentino traccia di sostanze non autorizzate (art. 14).

Registro trattamenti. Come il Decreto Legislativo n. 336 del 4 agosto 1999, anche il presente Decreto ribadisce l'obbligo di annotazione dei trattamenti veterinari. Il veterinario curante annota in un apposito registro, tenuto nell'azienda e diverso da quello previsto al punto 4, comma 3, la data, la natura del trattamento terapeutico

prescritto o eseguito, il numero di identificazione degli animali trattati ed i corrispondenti tempi di sospensione. Il detentore degli animali è tenuto ad annotare nel registro, entro 24 ore dall'inizio e dalla fine del trattamento, la data ed la natura del trattamento eseguito. Il registro di cui sopra, che può essere quello previsto dal Decreto Legislativo n. 119/1992, deve essere tenuto in azienda e conservato dal titolare della medesima, unitamente alle ricette, per almeno cinque anni (art. 15).

Controlli. Ai sensi dell'art. 16 l'autorità sanitaria competente deve procedere all'esecuzione di controlli a campione nelle fasi di produzione, manipolazione, magazzinaggio, trasporto, distribuzione, vendita ed acquisto delle sostanze anabolizzanti e non consentite (stilbeni e loro derivati, agenti antitiroidei, steroidi, lattoni dell'acido resorcilico, β -agonisti, sostanze di cui all'allegato IV del Regolamento 2377//90/CEE). L'autorità sanitaria deve altresì procedere al controllo dei mangimi destinati agli animali, sia nella fase di produzione che in quella di distribuzione dei medesimi, nonché a controlli durante il processo di allevamento degli animali e di prima trasformazione dei prodotti di origine animale.

Sanzioni. L'art. 32 stabilisce le sanzioni amministrative previste per la violazione delle norme contenute nel presente Decreto ⁽²⁶⁾.

1.2 PIANO NAZIONALE RESIDUI

Nella Comunità Europea il problema dei residui delle sostanze ad azione anabolizzante utilizzate in zootecnica venne alla ribalta nel 1981 con la Direttiva 81/602/CEE, concernente il divieto alla somministrazione di talune sostanze ad azione ormonica e delle sostanze ad azione tireostatica.

In relazione al problema dei residui di anabolizzanti nelle carni, con questa Direttiva gli Stati membri decidevano di vietare la somministrazione agli animali in allevamento di sostanze ad azione tireostatica, estrogena, androgena e gestagena e l'immissione sul mercato di animali ai quali fossero state somministrate dette sostanze. L'articolo 4 della

Direttiva permetteva, tuttavia, l'utilizzo al solo scopo terapeutico di alcune molecole ad azione estrogena, androgena e gestagena, autorizzate in conformità alle direttive concernenti i medicinali veterinari. La possibilità di impiegare cinque ormoni (estradiolo, progesterone, testosterone, trenbolone e zeranolo) in allevamento a scopo d'ingrasso, rimaneva ancora oggetto di studi ulteriori allo scopo di determinarne la pericolosità per la salute pubblica e permetterne quindi l'eventuale autorizzazione futura. In relazione a questo provvedimento, la Comunità Europea, con la Direttiva 86/469/CEE, decise di istituire dei piani sistematici di controllo degli animali e delle carni fresche per la presenza di residui di medicinali veterinari e di altri contaminanti, ritenuti un rischio per la salute del consumatore oltre che un danno per la qualità delle carni.

Fino ad allora, le modalità di controllo, la frequenza dei campionamenti e le concentrazioni massime consentite di residui di farmaci e contaminanti ambientali erano disciplinate in maniera profondamente eterogenea nei vari Stati membri. Ciò comportava, fra l'altro, notevoli ostacoli agli scambi intracomunitari ed una distorsione delle condizioni di concorrenza tra produzioni. Pertanto fu necessario trovare una soluzione globale ed uniforme per l'effettuazione dei controlli all'interno della Comunità per la ricerca di residui negli animali di allevamento, nelle carni e nei prodotti a base di carne, sia che questi prodotti fossero destinati al mercato nazionale degli Stati membri oppure agli scambi intracomunitari. Venne quindi stabilito che gli Stati membri elaborassero un Piano annuale di controllo tenendo conto della propria specifica situazione. La Direttiva 86/469/CEE sanciva, inoltre, che i campionamenti fossero eseguiti in modo ufficiale secondo criteri comuni per le diverse categorie di sostanze interessate e che i campioni venissero analizzati in laboratori ufficialmente autorizzati. Qualora una determinazione analitica avesse rilevato la presenza di residui di sostanze non consentite o di sostanze consentite in concentrazione superiore al limite ammesso (campione non conforme), si imponeva l'adozione di misure comuni intese ad accertare la causa della non conformità, ad eliminare il problema e ad assicurare che i

prodotti coinvolti fossero effettivamente esclusi dal consumo. Ciascun Paese membro doveva quindi provvedere affinché la ricerca dei residui negli animali, nei loro escrementi e liquidi biologici, nonché nei tessuti e nelle carni fresche, venisse eseguita conformemente alle prescrizioni dettate dalla Direttiva 86/469/CEE. Inoltre, i singoli Paesi della Comunità Europea affidavano ad un servizio o organismo centrale il compito di coordinare l'esecuzione dei controlli previsti dalla stessa Direttiva. Tale organismo doveva coordinare le attività dei servizi regionali effettivamente incaricati di effettuare i controlli, raccogliere i risultati e le informazioni che sarebbero state trasmesse alla Commissione, ed infine, e di primaria importanza, elaborare annualmente i piani stessi. All'articolo 4 la Direttiva richiedeva esplicitamente a ciascun Paese membro di redigere un piano che indicasse le misure nazionali da attuare per realizzare l'obiettivo previsto per la ricerca di sostanze anabolizzanti, tireostatiche e derivate dallo stilbene (categorie A, I e II) ed un piano che indicasse le misure relative alla ricerca di residui per le sostanze appartenenti ad altri gruppi come antibiotici, β -bloccanti e contaminanti ambientali (categoria A, III e categoria B, I e II). L'elenco completo e la classificazione delle sostanze da ricercare era riportato nell'Allegato I della Direttiva.

Riassumendo, da questo momento in poi, ogni Paese membro, tenendo conto della propria situazione specifica, avrebbe dovuto farsi carico:

- della legislazione relativa all'impiego, al divieto, all'autorizzazione, alla distribuzione delle sostanze citate;
- delle indicazioni da fornire nonché dell'organizzazione di coloro che eseguiranno i piani di controllo;
- di stilare l'elenco delle sostanze ricercate, dei metodi di analisi, nonché delle norme relative all'interpretazione dei risultati;
- della natura delle misure previste dalle autorità competenti per i prodotti alimentari risultati non conformi.

L'approvazione dei singoli piani nazionali veniva decisa dalla Commissione europea previa verifica della loro conformità ai requisiti della Direttiva CEE 86/469; in caso di mancata approvazione lo Stato membro avrebbe dovuto modificare e/o completare il piano proposto.

L'Italia promulgò il piano di controllo dei residui contenuto nell'Allegato della Circolare del Ministero della sanità n. 12 dell'8 febbraio 1988, relativa ai piani per il controllo dei residui di sostanze ormonali anabolizzanti ed antiormonali negli animali e nelle carni.

Il piano italiano, che riguardava esclusivamente la ricerca delle sostanze A,I e A,II, veniva approvato contestualmente nello stesso febbraio del 1988 dalla Commissione Europea (Decisione 88/199/CEE). La Circolare n.12 indicava nel dettaglio i controlli da effettuare negli allevamenti e nei macelli al fine di reprimere l'illecito impiego di sostanze utilizzate come fattori di crescita (estrogeni, androgeni, progestinici) e sostanze ad azione antiormonale (tireostatici). I controlli dovevano svolgersi in conformità a due distinti programmi tra loro integrati: il Piano CEE o Comunitario (Piano Italiano) ed il Piano Nazionale.

Il Piano CEE rappresentava l'attuazione vera e propria della Direttiva 86/469/CEE ed insisteva sull'importanza che i campioni da esaminare dovessero essere prelevati con criteri di assoluta casualità ed essere effettuati in un numero statisticamente significativo di soggetti e, comunque, non inferiore a quello attribuito a ciascuna Regione ed Istituto. Inoltre, in base agli esiti delle analisi, della disponibilità di nuove metodiche analitiche e del miglioramento delle modalità di campionamento, il Piano avrebbe potuto subire variazioni nel corso degli anni riguardo al numero di campioni da prelevare e alle sostanze da esaminare.

Il Piano Nazionale rappresentava un'integrazione del Piano CEE e veniva effettuato per ragioni di continuità con la vigilanza attuata negli anni antecedenti all'avvio del Piano Comunitario. Esso differiva da quest'ultimo sostanzialmente perché si orientava ad un controllo di massa degli animali con prelievo di campioni soprattutto in caso di

sospetto di trattamento illecito. Le modalità di prelievo, invio dei campioni ed i provvedimenti da adottarsi in caso di illecito erano comunque analoghi a quelli previsti dal Piano CEE. La Circolare 12/88 ribadiva il divieto per gli allevatori di detenere o somministrare agli animali sostanze ad azione ormonale (estrogeni, androgeni, progestinici) e sostanze ad azione antiormonale (tireostatici), nel caso in cui queste venissero utilizzate come fattori di crescita o di neutralizzazione sessuale negli animali destinati all'alimentazione umana. Invece, l'impiego di sostanze ad azione ormonale era consentito quando esse fossero incluse in specialità medicinali regolarmente autorizzate e somministrate da un veterinario. Durante questa fase di avvio si stabiliscono le frequenze di campionamento che serviranno a fissare i criteri che avrebbero regolato il passaggio alle fasi successive: fase intensiva e fase di *routine*. I laboratori ufficiali individuati per l'esecuzione degli accertamenti analitici sui campioni sono quelli degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, che hanno l'obbligo di operare conformemente ai metodi indicati per ciascun residuo, mentre il coordinamento delle norme e dei metodi di analisi è affidato all'Istituto Superiore di Sanità, che svolge la funzione di laboratorio di riferimento. Le sostanze da ricercare, secondo quanto indicato nella classificazione proposta dalla Direttiva 86/469/CEE, appartengono alle categorie A, I (sostanze stilbeniche, loro derivati, sali ed esteri; tireostatici; altre sostanze ad azione estrogena, androgena e gestagena ad eccezione di quelle della categoria A, II) e A, II (sostanze autorizzate conformemente all'articolo 4 della direttiva 81/602/CEE ed all'articolo 2 della direttiva 85/649/CEE). Le sostanze autorizzate a scopo terapeutico sotto forma di specialità medicinali erano le seguenti: clomadione, estradiolo, etinilestradiolo, norandrostenedione, progesterone, stanozololo e testosterone.

E' a partire dal 1989, sempre in attuazione della Direttiva 86/469/CEE (recepita successivamente con il D.L.vo 27 gennaio 1992, n.118), che in Italia vennero predisposti ed attuati Piani di campionamento per la ricerca di residui di sostanze ad azione ormonale, di farmaci e di contaminanti ambientali (PNR) così come li conosciamo oggi. Con la Circolare n. 6 del 13 aprile 1989 si apportavano alcune

modificazioni ed integrazioni alla Circolare n. 12 dell'8 febbraio 1988, che riguardavano in particolare i provvedimenti da adottarsi da parte delle autorità competenti in caso di riscontro di campioni positivi. La successiva Circolare n. 14 del 30 maggio 1989 realizzava, infine, compiutamente il primo ufficiale Piano Nazionale per la Ricerca dei Residui di Farmaci e Contaminanti Ambientali nelle Carni.

Dal 1989 ad oggi, il PNR ha subito una complessa evoluzione, presentando di anno in anno modificazioni ed aggiornamenti. Esso rappresenta infatti lo strumento scelto dal legislatore per assicurare l'attuazione dei controlli lungo la filiera in modo quanto più possibile omogeneo e coordinato fra le varie strutture (ASL, Enti Locali, Ministero della Salute) ed è impostato secondo il criterio della sorveglianza programmata nello spazio e nel tempo, in grado di realizzare un sistema capace di fornire informazioni attendibili circa il rischio al quale i consumatori sono esposti per le varie categorie di residui. Attraverso un meccanismo di *feedback* continuo, il PNR si evolve tenendo conto sia dei problemi emersi nei piani precedenti sia delle emergenze verificatesi nel corso degli anni e rappresenta quindi uno strumento dinamico che, pur essendo realizzato su scala nazionale, ottempera a quelle che sono le disposizioni emanate in ambito europeo, tramite provvedimenti che attuano una sorveglianza omogenea e programmata per tutti i Paesi membri dell'Unione.

Il PNR oggi si struttura tenendo conto delle prescrizioni del Decreto Legislativo 158/2006 e, per quanto riguarda le procedure per il prelievo ufficiale e la gestione dei campioni, secondo le indicazioni della Decisione della Commissione 98/179/CE del 23 febbraio 1998. Ai sensi del suddetto Decreto, i residui da ricercarsi sono classificati in due categorie:

- categoria A: sostanze ad effetto anabolizzante e non autorizzate (stilbeni, loro derivati e loro sali ed esteri; agenti antitiroidei; steroidi; lattoni dell'acido resorcilico, compreso lo zeranolo; β -agonisti; sostanze incluse nell'allegato IV del regolamento CEE n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990);
- categoria B: medicinali veterinari ed agenti contaminanti ambientali.

Da sottolineare, infine, la sempre maggiore importanza assunta dalle procedure di autocontrollo nelle filiere produttive, che si stanno estendendo a tutti i settori zootecnici ⁽²⁷⁾.

Capitolo 2

IL BOVINO E I TRATTAMENTI ILLECITI

2.1 IL COMPLESSO URETRO-PROSTATICO

La prostata, localizzata a livello della porzione iniziale dell'uretra, origina da gemme ghiandolari emesse durante la vita embrionale dalla parete del seno urogenitale, in prossimità delle terminazioni dei condotti mesonefrici. E' avvolta da una capsula connettivale, da cui si dipartono setti di tessuto connettivo lasso che, penetrando nella struttura ghiandolare, la suddividono in lobuli ad andamento convergente verso l'uretra. Nel bovino se ne distinguono due porzioni: una esterna e compatta, definita corpo prostatico, ed una interna, denominata prostata disseminata (*pars disseminata*).

Il corpo prostatico è a sua volta costituito da due lobi, che risultano però difficilmente distinguibili in relazione al loro limitato sviluppo. E' situato sulla superficie dorsale del tratto iniziale dell'uretra pelvica, in rapporto con il retto dorsalmente, con la vescica, le vescichette seminali ed i condotti deferenti cranialmente; la sua superficie ventrale abbraccia la parte prostatica dell'uretra, cui aderisce intimamente.

La prostata disseminata viene definita tale in quanto inclusa nella parete dell'uretra membranosa, a livello della sottomucosa, tra lo strato spongioso ed il muscolo uretrale; è molto sviluppata, soprattutto in corrispondenza della parte dorsale dell'uretra, mentre tende ad assottigliarsi nella porzione localizzata ventralmente ^(28,29,30).

Istologicamente, gli alveoli, i tubuli secernenti ed i condotti intraghiandolari sono rivestiti da un epitelio cubico o cilindrico semplice, che può appiattirsi leggermente nelle cavità alveolari più grandi; verso la porzione terminale dei condotti, in direzione dell'uretra, l'epitelio evolve da semplice ad epitelio di transizione, in continuità con quello uretrale.

L'uretra pelvica è rivestita da epitelio di transizione, che normalmente presenta 3-4 strati cellulari (31,32).

2.2 SOSTANZE IMPLICATE E LESIONI ISTOLOGICHE RICONDUCEBILI A TRATTAMENTO

Gli ormoni steroidei, naturali o di sintesi, classicamente utilizzati a scopo anabolizzante comprendono:

- estrogeni: 17- β -estradiolo, etinilestradiolo, dietilsilbestrolo;
- androgeni: testosterone, stanozololo, metiltestosterone, trenbolone, boldenone;
- gestageni: progesterone, clormadione acetato, medrossiprogesterone acetato.

Tali sostanze, per lo più impiegate in associazione tra loro o con cortisonici e β -agonisti, continuano ad essere quelle maggiormente implicate nell'ambito dei trattamenti illeciti, sebbene oggi, sulla base delle lesioni rilevate e delle indicazioni ottenute da chi lavora sul campo, sia fondato il sospetto che nuove sostanze, spesso di sintesi, siano allo stesso modo utilizzate a fini anabolizzanti (33,34,35,36).

Relativamente agli organi *target* degli ormoni steroidei sessuali, e quindi prostata ed uretra, è necessario premettere che la loro valutazione istopatologica dev'essere effettuata su campioni per i quali siano standardizzati metodo ed area di prelievo: ciò per non incorrere nel rischio, data la variabilità morfologica di prostata ed uretra lungo la loro estensione, di ottenere campioni non idonei ai fini della rilevazione delle alterazioni specifiche. L'area individuata come maggiormente significativa in questo senso (33,37,38) è la parte disseminata della prostata, comprensiva dell'uretra pelvica, di cui va prelevata una sezione dello spessore di 1 cm trasversalmente all'uretra pelvica, a circa 1 cm di distanza caudalmente al corpo della prostata (Figura1).

Le lesioni che, a questo livello, si rilevano a seguito di trattamento ormonale sono (6,9,33,37,38,39,40,41):

1. iperplasia dell'epitelio uretrale: numero degli strati epiteliali superiore a tre. Quando la proliferazione avviene a carico dello strato basale, si osservano gruppi multifocali di cellule che si approfondano moderatamente nel corion, alterando il profilo solitamente lineare della membrana basale. E' possibile inoltre osservare la presenza di invaginazioni uretrali più o meno estese e più o meno ramificate, riferibili ad adattamento della disposizione uretrale per aumento della sua estensione complessiva.

Le cellule sono caratterizzate da lieve aumento di volume con arrotondamento del margine superiore dello strato superficiale costituente il lume uretrale.

Il citoplasma è lievemente e diffusamente più eosinofilo e granuloso; il nucleo, leggermente aumentato di volume, è caratterizzato da cromatina finemente granulata.

2. Iperplasia dell'epitelio ghiandolare: gruppi di cellule epiteliali coese, non disposte secondo la normale struttura tipicamente tubulare del tessuto; si osservano piccoli gruppi di cellule, prevalentemente nelle zone periferiche della ghiandola, circondate da sottili tralci connettivali, nonché piccole aree di iperplasia a carico dei tubuli di maggior calibro, che tendono a protrudere nel lume tubulare stesso. Le cellule sono caratterizzate da lieve aumento dell'eosinofilia citoplasmatica e da minimo aumento delle dimensioni nucleari.
3. Metaplasia dell'epitelio uretrale: alterazione morfologica a carico di citoplasma, margini cellulari e nucleo. Le cellule sono caratterizzate da moderato aumento di volume e citoplasma marcatamente eosinofilo ed omogeneo; i contorni cellulari sono particolarmente evidenti ed eosinofili; il nucleo, ovale e lievemente aumentato di volume, è caratterizzato da cromatina moderatamente granulata e, talvolta, dalla presenza di un evidente nucleolo eosinofilo.
4. Metaplasia dell'epitelio ghiandolare: piccoli gruppi di cellule, soprattutto nelle zone periferiche della ghiandola, caratterizzate da perdita dei margini cellulari osservabili, aumento moderato e diffuso dell'eosinofilia citoplasmatica e

presenza di granuli diffusi di piccole dimensioni. Il nucleo, di forma ovale, è caratterizzato da moderato aumento delle dimensioni e da cromatina grossolanamente granulare.

Le lesioni fino qui presentate sono specificamente riconducibili a somministrazione di estrogeni, nonostante anche gli androgeni determinino un effetto iperplasizzante sull'epitelio sia uretrale che ghiandolare.

5. Dilatazione tubulare ed ipersecrezione: in sezione longitudinale, aumento delle dimensioni del diametro minore osservabile, con arrotondamento dell'aspetto complessivo e perdita delle caratteristiche spigolosità alla diramazione dei tubuli; in sezione trasversale, ectasia dei tubuli con formazione di spazi circolari otticamente vuoti. Quando presente, il secreto appare come materiale amorfo, omogeneo ed eosinofilo all'interno dei dotti. Tali lesioni, che arrivano fino alla formazione di vere e proprie cisti nel tessuto ghiandolare, sono tipicamente riferibili alla somministrazione e quindi all'azione degli androgeni. Da evidenziare che, a seguito di somministrazione sperimentale di boldenone, la lesione più frequentemente osservata nella prostata è invece la presenza di microcisti: un singolo tubulo o dotto si presenta arrotondato e ricco di secreto, talvolta in riassorbimento, in un contesto ghiandolare spesso morfologicamente normale. Questa lesione indica perciò un'azione del boldenone diversa da quella del classico androgeno, il quale determinerebbe la comparsa di aree di ipersecrezione più o meno estese, ma nelle quali comunque tutti i tubuli o dotti di uno o più lobuli sarebbero contemporaneamente coinvolti.

I quadri istopatologici finora descritti sono andati, negli anni, progressivamente modificandosi o comunque attenuandosi. In relazione alla probabile associazione di sostanze diverse, è diventata infatti sempre meno frequente l'osservazione della metaplasia squamosa a carico degli epitelii ghiandolare ed uretrale, mentre la lesione che ha continuato a presentarsi alla valutazione routinaria dei campioni e non riconducibile

a fattori fisiologici dell'animale è l'iperplasia da moderata a grave degli stessi, ma caratterizzata comunque, e soprattutto a livello uretrale, da aspetti morfologici lievemente diversi da quelli descritti: il citoplasma si mantiene più esteso, ma non omogeneo né acidofilo; anche i nuclei sono aumentati di volume, ma non granulari e quindi a cromatina compatta. Nonostante i contorni cellulari siano più marcati, non è possibile classificare la lesione neanche come metaplasia squamosa allo stato iniziale, ma piuttosto come iperplasia/ipertrofia degli epiteli.

Si è osservato inoltre che prostata ed uretra tendono a rispondere in modo diverso ai trattamenti ormonali: è frequente infatti rilevare lesioni, anche gravi e diffuse, a livello dell'epitelio uretrale in un contesto ghiandolare completamente normale o caratterizzato al massimo da iperplasie lievi, focali o multifocali, o viceversa, ma meno frequentemente, alterazioni a carico dell'epitelio ghiandolare non accompagnate da modificazioni uretrali.

Relativamente ai quadri ipersecretivi e di dilatazione tubulare, la lesione che ancora si osserva con maggiore frequenza è la presenza di ectasie lievi e focali, a localizzazione prevalentemente periuretrale o periferica, e la formazione di microcisti multifocali a livello ghiandolare.

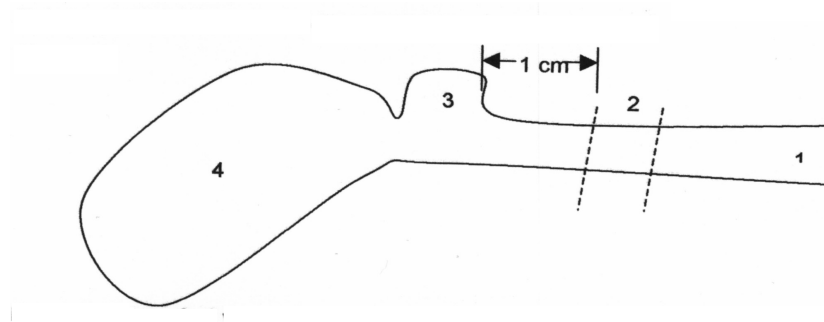


Fig. 1. Schema di prelievo della prostata con indicazione dei punti di repero: uretra pelvica (1) e area di prelievo della prostata disseminata (2); corpo della prostata (3); vescica(4).

Capitolo 3

L'IPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA NELL'UOMO

3.1 LA PROSTATA

Nell'uomo la prostata circonda la porzione iniziale dell'uretra, sviluppandosi a partire da un'invaginazione epiteliale lungo l'uretra prostatica. Più specificamente, le minime invaginazioni dell'uretra prossimale danno origine alle ghiandole periuretrali, mentre l'invaginazione situata più distalmente dà origine a cinque gruppi indipendenti di tubuli, che si accrescono e vanno a formare la ghiandola prostatica. In passato, la prostata veniva strutturalmente suddivisa in cinque lobi: anteriore, medio, posteriore e due lobi laterali; studi più recenti, supportati dall'evidenza che le malattie prostatiche non seguano i limiti dei lobi, ne identificano invece cinque distinte regioni. Una zona anteriore, che corrisponde al lobo anteriore originariamente descritto, composta principalmente da stroma fibromuscolare e da alcune ghiandole prostatiche; una zona periferica, equivalente ai lobi posteriore e laterali, che costituisce circa il 75% della componente ghiandolare della prostata e contiene ghiandole semplici a stroma lasso; una zona centrale, situata fra i dotti eiaculatori e separata dalla zona periferica da trabecole fibrose, la cui sede si avvicina all'originario lobo medio. Le ghiandole periuretrali, a manicotto attorno all'uretra prossimale, rappresentano la quarta zona. La zona più recentemente descritta, definita di transizione, contiene ghiandole che terminano nell'uretra prossimale ed è localizzata anteriormente alla zona centrale. In questa sede si sviluppa la maggior parte dei noduli iperplastici.

Istologicamente, la prostata dei neonati è composta da semplici tubuli, che si irradiano dall'uretra con abbondante stroma primitivo fibromuscolare interposto. L'uretra ed i dotti prostatici distali presentano spesso metaplasia squamosa indotta dagli estrogeni

materni in utero, che scompare gradatamente nei primi mesi dopo la nascita. La responsività agli estrogeni nella prostata adulta è comunque mantenuta, come dimostra la metaplasia squamosa osservata a seguito di terapia estrogenica per adenocarcinoma prostatico.

L'aspetto istologico della prostata adulta viene raggiunto durante l'accrescimento postnatale: le ghiandole tubuloalveolari sono aggregate ed avvolte in uno stroma fibromuscolare in continuità con la capsula fibrosa; l'epitelio acinare è cilindrico pseudostratificato, con uno strato di cellule basali adiacenti alla lamina basale. Un epitelio simile riveste anche i dotti escretori per gran parte della loro lunghezza fino all'uretra, dove si modifica diventando epitelio di transizione in continuità con quello uretrale. Lo stroma fibromuscolare contiene muscolatura liscia, collagene e fibre elastiche orientate circolarmente attorno agli acini e ai dotti ^(42,43,44,45).

3.2 L'IPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA

L'iperplasia prostatica benigna (BPH) è un disordine proliferativo ad andamento progressivo che tipicamente si manifesta a livello della sottomucosa dell'uretra prossimale, recentemente descritta come zona di transizione della prostata. La BPH, nelle forme precoci, si presenta come proliferazione epiteliale acinare e duttale, che arriva fino alla formazione di veri e propri noduli ed al conseguente notevole aumento di volume della ghiandola nel suo complesso. I noduli maturi sono ben delimitati, anche se privi di una vera e propria capsula, e tendono a loro volta ad accrescersi comprimendo il lume uretrale ed il tessuto ghiandolare vicino. Oltre alla proliferazione delle cellule epiteliali di acini e dotti, solitamente partecipano al processo, in varie proporzioni, anche fibrocellule muscolari lisce e fibroblasti stromali.

Per quanto riguarda la sua patogenesi, prima che ne venisse compresa la natura iperplastica, l'ingrossamento prostatico era considerato neoplastico, ipertrofico, infiammatorio o di natura vascolare. Gli eventi istogenetici precoci nell'evoluzione

della BPH non sono comunque ancora del tutto chiari. Si è postulato che l'interazione stroma-epitelio dia origine ai noduli iperplastici, sebbene non sia completamente definito se sia lo stroma ad indurre la proliferazione epiteliale o viceversa ⁽⁴⁶⁾. Inoltre, se inizialmente si riteneva che nella BPH lo stroma aumentasse in modo non proporzionale all'epitelio, studi più recenti hanno dimostrato che in realtà il rapporto stroma-epitelio rimane lo stesso rispetto alla prostata normale e ciò darebbe ulteriore conferma del fatto che sia la proliferazione stromale che quella epiteliale siano contemporaneamente coinvolte nello sviluppo della BPH ⁽⁴⁷⁾. Relativamente al possibile meccanismo di induzione della BPH, si ritiene che un ruolo fondamentale sia svolto da fattori endocrini, che comprendono l'azione di ormoni sia androgeni che estrogeni: nonostante con l'invecchiamento si assista ad un progressivo calo di testosterone prodotto dal testicolo, il concomitante aumento dei livelli sierici di estrogeni andrebbe di fatto a facilitare l'azione degli androgeni sul tessuto prostatico, con conseguenti effetti sulla proliferazione ghiandolare ^(13,46). La prostata presenta infatti un'ampia distribuzione di recettori per gli androgeni, che indicano come il suo sviluppo sia completamente dipendente da essi. In riferimento all'ipotesi secondo cui anche le cellule NE svolgerebbero un ruolo nella crescita e nella differenziazione prostatica e sarebbero quindi implicate nello sviluppo della BPH, è da sottolineare che esse invece normalmente non esprimono tali recettori, suggerendone perciò un meccanismo di regolazione androgeno-indipendente. Il possibile coinvolgimento delle cellule NE nella patogenesi della BPH, supportato dalla loro localizzazione strategica rispetto alle cellule epiteliali proliferative, le vedrebbe piuttosto svolgere una funzione di intermediarie nell'interazione stroma-epitelio attraverso un meccanismo di tipo paracrino, autocrino ed endocrino sulla crescita, sulla differenziazione e sulle secrezioni prostatiche ^(48,49).

Capitolo 4

LE CELLULE NEUROENDOCRINE

4.1 L'UOMO

A partire dalla prima descrizione di Pretl nel 1944 ⁽⁵⁰⁾, molti autori hanno successivamente condotto studi morfologici ed immunoistochimici sulle cellule neuroendocrine prostatiche.

L'epitelio prostatico è costituito da tre distinte popolazioni cellulari: le cellule basali, con funzione proliferativa, le cellule luminali secretorie e le cellule neuroendocrine (NE) ^(11,12,13,23,51). Rispetto agli altri organi dell'apparato urogenitale, le cellule NE sono particolarmente numerose nella prostata ⁽¹¹⁾, soprattutto a livello acinare e duttale periuretrale piuttosto che nelle parti periferiche della ghiandola ⁽²³⁾: il più comune schema di distribuzione indica la presenza di 1 - 3 cellule NE per acino o dotto ⁽¹⁸⁾. Sono uno dei tipi cellulari appartenenti al sistema di cattura e decarbossilazione dei precursori amminici (APUD): contrariamente a quanto si ritenesse inizialmente ⁽¹¹⁾, solo una piccola parte di questi tipi cellulari sarebbe di derivazione neurale, mentre per lo più esse avrebbero origine comune alle cellule esocrine, mantenendo infatti molte delle caratteristiche dei loro progenitori embriologici, tra cui gli stessi fenotipi cheratinici K5, K14 e K18. Sono localizzate nel comparto basale e morfologicamente si possono identificare due tipi di cellule NE:

- aperte: a forma di “fiasco”, con lunghe e slanciate estensioni dendritiche verso il lume ghiandolare;
- chiuse: prive di estensioni dendritiche luminali, ma che spesso presentano processi orizzontali o obliqui ^(11,23,51,52).

Le cellule NE svolgono un importante ruolo nella regolazione dell'epitelio ghiandolare (11,15,23,49,53). I fattori che ne suggeriscono il coinvolgimento nella crescita e nella differenziazione della prostata in sviluppo, così come nella regolazione del processo secretorio della ghiandola matura sono: (1) la loro morfologia; (2) l'analogia con la fisiologia delle cellule NE presenti in altri, e più estensivamente studiati, organi; (3) la funzione nota dei loro prodotti di secrezione. Relativamente a quest'ultimo punto, esse secernono più di 200 differenti peptidi neuroendocrini in grado di indurre un'ampia varietà di eventi biologici intracellulari (11,49). I prodotti di secrezione maggiormente espressi sono Serotonina (5-HT) e Cromogranina A (ChrA): alla valutazione istochimica ed immunohistochemica, le cellule NE prostatiche risultano essere per la maggior parte immunoreattive ad anticorpi anti-5-HT ed argirofile (in riferimento alla caratterizzazione istochimica dei loro granuli di secrezione), mentre mostrano una minore immunoreattività ad anticorpi anti-ChrA, presentando solo sporadicamente caratteristiche di argentaffinità (18,48,54,55).

Appaiono essere cellule non proliferative, ma è stato osservato che le cellule epiteliali proliferative sono preferenzialmente localizzate in prossimità delle cellule NE e ciò suggerisce quindi che i fattori di crescita secreti da queste ultime effettivamente regolino in modo paracrino ed autocrino la proliferazione delle cellule epiteliali (12,49,56,57). Inoltre, attraverso il fluido prostatico, esse eserciterebbero anche un'azione di tipo endocrino sul tessuto ghiandolare (49).

In relazione alle loro caratteristiche ed alle loro funzioni, le cellule NE della prostata umana sono state correlate a disordini proliferativi quali BPH e carcinoma prostatico (PC): esse interverrebbero infatti nella patogenesi e nello sviluppo della BPH, ed un elevato numero di cellule NE sembrerebbe essere associato ad una prognosi sfavorevole nel PC, in modo particolare nei casi resistenti alla terapia ormonale (15,23,49).

Sempre riguardo al loro ruolo nello sviluppo ghiandolare, nell'uomo le cellule NE compaiono precocemente durante lo sviluppo fetale e la loro densità (numero di cellule NE/numero totale di cellule epiteliali) nella prostata normale rimane costante dal feto

all'adulto giovane: ciò darebbe ulteriore conferma del loro significato funzionale in quanto la densità di cellule raggiunta in età precoce sarebbe sufficiente a mantenere una sorta di stato di equilibrio nel *turnover* delle cellule epiteliali prostatiche in condizioni normali, attraverso la secrezione paracrina di sostanze coinvolte nella crescita e nella propagazione cellulare. Nella BPH è stato invece osservato un incremento del numero di cellule NE a livello dei noduli iperplastici ⁽⁵⁴⁾. Nel corso di studi più recenti ⁽¹⁵⁾, ulteriori approfondimenti in questo senso hanno invece dimostrato che, in realtà, nelle forme precoci di BPH il numero di cellule NE è più alto che nel tessuto prostatico normale, mentre nei noduli maturi il loro numero diminuisce. Considerando la loro origine comune agli altri due tipi cellulari del comparto epiteliale, la loro marcata diminuzione nei noduli iperplastici maturi è dunque verosimile con il fatto che queste cellule non siano direttamente responsabili della crescita della BPH, ma aumentino nelle strutture in crescita (soggetti prepuberi) e nella BPH precoce in relazione alla loro funzione di mediatori nell'interazione stroma-epitelio, che interverrebbe appunto nella crescita e nella propagazione cellulare ⁽¹⁶⁾. Dagli studi finora condotti, i fattori coinvolti in tale meccanismo risulterebbero essere la Serotonina, in quanto peptide maggiormente espresso dalle cellule NE e per analogia con il ruolo da essa svolto nello sviluppo di altri apparati, ma anche fattori umorali locali, quali i fattori di crescita fibroblastica prodotti dalle cellule stromali e le interleuchine secrete dalle cellule epiteliali ^(12,15,19,20,21,49).

4.2 IL BOVINO

La presenza delle cellule NE è stata recentemente descritta nelle ghiandole sessuali accessorie maschili e nell'uretra femminile di bovino ^(24,58).

Nel maschio, esse sono particolarmente numerose nel complesso prostatico e nell'uretra pelvica. Nella prostata sono distribuite tra le cellule epiteliali, sono più abbondanti nel corpo piuttosto che nella parte disseminata e presentano un piccolo

corpo cellulare ovale e processi allungati. Le numerose cellule NE uretrali (*pars prostatica*) sono invece slanciate, bipolari o multipolari e per lo più si estendono attraverso l'epitelio dalla membrana basale al lume, al quale arrivano con un processo apicale talvolta biforcuto; si insinuano inoltre tra le altre cellule epiteliali con proiezioni citoplasmatiche dirette lateralmente (Figura 2).

Relativamente ai loro prodotti di secrezione ed alla loro caratterizzazione istochimica

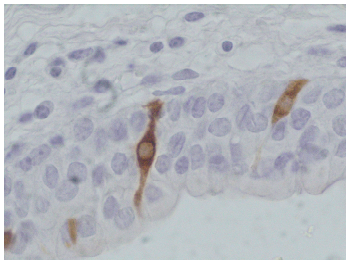


Fig. 2. Aspetto morfologico tipico delle cellule NE a livello dell'epitelio uretrale bovino (5-HT- 40x).

ed immunoistochimica, sia nella prostata che nell'epitelio uretrale le cellule NE contengono granuli prevalentemente argirofili e per la maggior parte presentano immunoreattività alla 5-HT; le cellule immunoreattive alla ChrA e contenenti granuli argentaffini sono invece presenti in numero esiguo (24,59,60).

Per quanto riguarda il loro ruolo, con particolare riferimento alle cellule secernenti 5-HT a localizzazione uretrale, la presenza di lunghe estensioni dendritiche bipolari o spesso multipolari è probabilmente correlabile con le funzioni da esse svolte: esse infatti riceverebbero stimoli chimici attraverso le loro terminazioni luminali e, in risposta, rilascerebbero 5-HT a livello delle loro proiezioni laterali o basali; in questa localizzazione, le cellule NE eserciterebbero quindi un'influenza paracrina sulle vicine cellule epiteliali. Più in particolare, la secrezione paracrina di 5-HT sarebbe compatibile, specialmente per quelle cellule NE dotate di processi multipolari che si insinuano tra le cellule epiteliali, con lo scopo di esercitare un'influenza diretta sull'attività secretoria dell'epitelio uretrale. Può inoltre essere ipotizzata anche un'azione autocrina, così come descritto in altri apparati e strutture, tra quelle cellule NE che nello stesso epitelio siano localizzate in stretta vicinanza tra loro (24,25,59).

Capitolo 5

L'INTERAZIONE STROMA-EPITELIO

Lo sviluppo della prostata umana è controllato da diversi polipeptidi di crescita, tra cui i fattori di crescita fibroblastica (FGF) e le interleuchine (IL) ^(19,20,61,62,63).

Per quanto riguarda i fattori di crescita fibroblastica, FGF-7 e FGF-2 sono quelli maggiormente espressi nella prostata normale: prodotti dalle cellule stromali, essi sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule epiteliali *in vitro* (colture primarie) e, attraverso appropriati recettori presenti sulle cellule epiteliali, possono agire da fattori di crescita paracrina per l'epitelio prostatico anche *in vivo* ^(19,20,61).

La concentrazione di FGF-7 e FGF-2 è aumentata in modo significativo nella prostata iperplastica rispetto alle zone periferica e di transizione della prostata normale, sebbene già in condizioni normali la zona di transizione ne presenti livelli più alti che nella zona periferica: ciò indica, innanzitutto, una fondamentale differenza nella biologia delle due zone, ma risulta anche compatibile con il fatto che essi effettivamente svolgano un ruolo importante nell'eventuale sviluppo di BPH. Da specificare, inoltre, che l'aumentata concentrazione dei due FGF nella BPH non è dovuta alla presenza di una maggiore percentuale di stroma nel tessuto ^(19,20,64).

FGF-7 è un potente mitogeno per le cellule epiteliali prostatiche: pur essendo un mediatore di derivazione tipicamente stromale, FGF-7 è stato rilevato anche a livello delle cellule epiteliali, suggerendo quindi che esso agisca sia in modo paracrina che in modo autocrino sulla proliferazione epiteliale in corso di BPH ⁽²⁰⁾.

FGF-2 è un fattore di crescita prodotto dalle cellule stromali, in grado di agire sia come fattore paracrina di crescita per le cellule epiteliali, sia come fattore autocrino nei confronti delle stesse cellule stromali; ne è stata inoltre rilevata, seppure in minore quantità, anche una localizzazione epiteliale, a livello delle cellule basali ^(19,64,65,66,67).

Per entrambi, le cellule stromali che li esprimono tendono ad essere preferenzialmente localizzate in prossimità degli acini epiteliali. Inoltre, il numero di cellule positive ad anticorpo anti-FGF-2, valutato attraverso un semplice protocollo di conta cellulare, è risultato significativamente più alto nell'area periacinare, la quale presentava altresì un andamento in crescita, seppure in questo caso non statisticamente significativo, a livello della zona di transizione sia nel tessuto prostatico normale che in quello iperplastico (19,20).

L'analisi quantitativa della proliferazione cellulare con immunistochemica anti-Ki67, effettuata su sezioni congelate di tessuto prima dell'estrazione proteica, ha rivelato che nella BPH essa è fortemente correlata al contenuto di FGF-7 e di FGF-2 e ciò è dunque compatibile con il ruolo chiave di tali fattori di crescita nel determinare l'anomala proliferazione epiteliale che si verifica appunto nella BPH. Tale correlazione è stata la prima dimostrazione che le alterazioni di concentrazione dei fattori di crescita fibroblastica possono essere direttamente legate ed avere quindi conseguenze funzionali importanti sull'aumentata proliferazione delle cellule epiteliali anche nella BPH *in vivo*.

I fattori che, a loro volta, controllano l'espressione di FGF-7 e FGF-2 sono stati individuati rispettivamente nell'IL-1 α e nell'IL-8.

L'IL-1 α è prodotta dalle cellule epiteliali ed, *in vitro*, è in grado di agire sulle cellule stromali come fattore paracrino di induzione alla produzione di FGF-7; è stata inoltre rilevata la presenza di quantità sostanziali di IL-1 α anche nella prostata *in vivo* e la sua concentrazione è risultata strettamente correlata al contenuto di FGF-7 nel tessuto iperplastico. La proliferazione epiteliale che si verifica nella BPH sarebbe quindi controllata da un doppio meccanismo paracrino in cui le cellule epiteliali producono IL-1 α , la quale stimola la produzione da parte delle cellule stromali di FGF-7, che a sua volta induce la proliferazione epiteliale e l'ulteriore produzione di IL-1 α , determinando come effetto finale l'aumento della massa prostatica a livello della zona di transizione,

individuata appunto come critica nella patogenesi della BPH ^(19,20). Sebbene i dati indichino che la secrezione di FGF-7 sia indotta dall'IL-1 α , esistono sicuramente altri fattori che ne controllano l'espressione dal momento che alcuni campioni di tessuto prostatico normale ed iperplastico non presentano quantità rilevabili di IL-1 α , ma hanno comunque un'espressione significativa, per quanto più bassa, di FGF-7. Un fattore che, *in vitro*, induce l'espressione di FGF-7 nelle cellule stromali sono gli androgeni ed è importante sottolineare che le stesse cellule epiteliali positive per FGF-7 sono risultate esprimere uniformemente anche i recettori per gli androgeni. Il ruolo di questi ultimi in tal senso è però controverso in quanto osservazioni effettuate su ratti castrati hanno indicato che, in realtà, l'espressione di FGF-7 diminuisce. Sarebbero quindi necessari ulteriori studi per determinare l'effettivo ruolo degli androgeni o di altri fattori eventualmente coinvolti nel controllo dell'espressione prostatica di FGF-7 e se essi vadano ad interagire con l'IL-1 α ⁽²⁰⁾. Indagini in questo senso, che verranno esposte in seguito, hanno invece considerato il possibile effetto della stimolazione con estrogeni (estradiolo), o meglio dello sbilanciamento nel rapporto estrogeni/androgeni, su FGF-7 e FGF-2 e quindi se l'aumento nell'espressione dei recettori specifici per gli ormoni steroidei sessuali che ne derivava fosse in qualche modo correlabile alla sintesi degli FGF ⁽⁶⁴⁾.

L'IL-8, da studi condotti *in vitro* su colture primarie di cellule epiteliali ⁽¹⁹⁾, si è rivelata il maggiore induttore paracrino alla produzione di FGF-2 da parte delle cellule stromali. Studi immunohistochimici effettuati su sezioni congelate di tessuto prostatico (della zona periferica e di transizione) normale ed iperplastico hanno dimostrato che anche *in vivo* esiste una correlazione tra l'aumento dei livelli di IL-8 e di FGF-2. L'IL-8 risulta infatti esercitare una stimolazione paracrina sulle cellule stromali relativamente alla produzione di FGF-2 e quest'ultimo si è dimostrato in grado di agire sia come fattore autocrino di crescita per le cellule stromali sia come fattore paracrino per le cellule epiteliali. Similmente a quanto avviene tra FGF-7 ed IL-1 α , è quindi possibile che si

stabilisca un doppio controllo paracrino in cui: l'IL-8 secreta dalle cellule epiteliali induce l'espressione di FGF-2 da parte delle cellule stromali; FGF-2 a sua volta induce la proliferazione epiteliale ed il conseguente aumento dell'espressione di IL-8, la quale torna a determinare un incremento nella produzione di FGF-2 e così via. Tale meccanismo andrebbe a sfociare, come effetto finale, nella proliferazione aumentata e poco controllata delle cellule sia stromali che epiteliali.

L'evidenza che le cellule stromali che esprimono FGF-7 e FGF-2 siano aumentate in prossimità degli acini epiteliali e che la loro espressione sia rispettivamente indotta dall'IL-1 α e dall'IL-8, o comunque ad esse correlata, indica quindi che l'interazione stroma-epitelio abbia di fatto importanti implicazioni nella fisiopatologia della BPH.

Inoltre, e come precedentemente accennato, per verificare se la sintesi di FGF-7 e FGF-2 potesse essere correlabile all'espressione dei recettori stromali per gli estrogeni (ER) e per gli androgeni (AR), è stato condotto uno studio su cellule stromali in coltura, che sono state sottoposte a stimolazione con alte e basse dosi di estradiolo e testosterone, mimando cioè i diversi livelli ormonali che caratterizzano l'uomo giovane e di età avanzata: la BPH compare infatti quando i livelli di testosterone calano ed aumentano quelli di estrogeni con conseguente incremento del rapporto estrogeni/androgeni ed è stato a lungo sospettato che tale sbilanciamento fosse implicato nell'eziologia della BPH. I risultati hanno confermato che l'espressione di ER aumenta (+25%), ma comunque in modo non indipendente da quella degli AR, per i quali ne è stato rilevato un incremento altrettanto consistente; anche relativamente all'aumento dei livelli di FGF-7 e FGF-2 ne è risultata una correlazione significativa con l'espressione di ER ed AR. Se quindi si riteneva che la sintesi di FGF-7 e di FGF-2 fosse sostanzialmente sotto il controllo degli androgeni ^(65,68), i dati ottenuti da questo studio indicherebbero che, in realtà, anche l'attivazione degli ER sia coinvolta nella loro espressione. Più specificamente, nella BPH l'aumento congiunto dei livelli di estradiolo plasmatico e dei recettori per gli estrogeni sarebbe quindi compatibile con il fatto che

anch'essi intervengano nel modulare la sintesi degli FGF e, conseguentemente, le modificazioni delle cellule sia stromali che epiteliali ⁽⁶⁴⁾.

Per quanto riguarda, infine, il meccanismo d'azione degli FGF, i recettori tramite cui essi andrebbero ad agire sulle cellule stromali e/o epiteliali sono stati individuati in FGFR-2 per FGF-7 ed in FGFR-1 per FGF-2: per entrambi ne è stata descritta localizzazione epiteliale ed endoteliale, mentre FGFR-1 è risultato essere espresso anche a livello delle cellule stromali ⁽⁶⁷⁾. Gli studi finora condotti su colture cellulari primarie di cellule prostatiche ed attraverso analisi mediante *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) per valutare rispettivamente l'effetto del medium condizionato (SCM) e dell'estratto di cellule stromali (SCE) sulla crescita epiteliale e stromale, e l'espressione di mRNA per FGF-7, FGF-2, FGFR-2 e FGFR-1 nelle stesse cellule hanno dimostrato che:

- sia SCM che SCE stimolano la crescita stromale ed il loro effetto è completamente soppresso dall'anticorpo neutralizzante anti-FGF-2, ma non dall'anticorpo neutralizzante anti-FGF-7;
- SCM stimola anche la crescita epiteliale, ma anche in questo caso la sua azione non viene soppressa dall'anticorpo neutralizzante anti-FGF-7, solo in parte invece dall'anticorpo neutralizzante anti-FGF-2;
- le cellule stromali esprimono mRNA per FGF-2, FGF-7 e FGFR-1, mentre le cellule epiteliali esprimono mRNA solo per FGFR-2.

Ciò starebbe quindi ad indicare che FGF-2 vada primariamente ad agire sulle cellule stromali per meccanismo autocrino mediante FGFR-1, mentre FGF-7 svolga un'azione paracrina sulle cellule epiteliali attraverso FGFR-2 ^(69,70).

Capitolo 6

MATERIALI E METODI

6.1 SCELTA DEL CAMPIONE

Sono state considerate sezioni di prostata disseminata, comprensiva dell'uretra pelvica (*pars prostatica*), appartenenti ai seguenti animali:

- Esperimento 1 (E1): 27 vitelli a carne bianca, omogenei per razza (Frisona), età, peso e condizioni di allevamento. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi sperimentali di 9 animali ciascuno in base alla tipologia di trattamento: gruppo EB: 10 mg 17 β -estradiolo + 200 mg boldenone; gruppo ET: 10 mg 17 β -estradiolo + 200 mg testosterone; gruppo C1: controlli non trattati. I trattamenti sono stati effettuati ogni 15 giorni negli ultimi due mesi di vita degli animali, per un totale di 4 iniezioni sottocutanee/capo, ed i vitelli sono stati macellati ad un'età di 8 mesi.
- Esperimento 2 (E2): 14 vitelli a carne bianca, anche in questo caso omogenei per razza (Bruna Alpina austriaca), età, peso e condizioni d'allevamento. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali di 7 animali ciascuno: gruppo B, cui sono stati somministrati 0.9 mg boldenone + 0.1 mg boldione (precursore del boldenone) in etanolo/capo/giorno *per os* per 45 giorni; gruppo C2, costituito dai controlli non trattati, cui è stata comunque somministrata, con la stessa modalità, un'analogia quantità di latte addizionato con solo etanolo (solvente del boldenone) per pareggiare i dati riguardanti lo stress prodotto negli animali. I vitelli sono stati macellati a 6 mesi di età.

I campioni sono stati prelevati al macello, fissati in formalina tamponata al 4% e processati ed inclusi in paraffina con metodiche standard ai fini dell'analisi istopatologica.

6.2 METODICHE APPLICATE

6.2.1 Istochimica

Sezioni di prostata (*pars disseminata*) ed uretra pelvica dello spessore di 4 μm sono state esaminate in Ematossilina-Eosina (EE) per valutare la presenza di iperplasia e/o metaplasia squamosa a carico degli epitelii. Inoltre, sezioni consecutive di ciascun campione sono state incubate con lectina biotinilata BSI-B₄ (*Griffonia simplicifolia*; Vector Laboratories, Burlingame, U.K.) per confermare l'eventuale osservazione di metaplasia squamosa attraverso la rilevazione *in situ* di specifiche modificazioni nell'espressione dei glicconiugati di superficie a livello della membrana cellulare. Brevemente, la procedura applicata è stata la seguente: sparaffinatura, reidratazione ed incubazione con perossido di idrogeno al 30% (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, U.S.) per 20 minuti, seguita da smascheramento antigenico effettuato mediante trattamento enzimatico con tripsina pronta all'uso (Digest-All2 Trypsin, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, U.S.) per 10 minuti a 37°C. Le sezioni sono state quindi incubate con lectina BSI-B₄, ad una concentrazione d'uso di 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, per 1 ora a temperatura ambiente. E' stato applicato il complesso avidina-biotina (ABC Kit - Vector Laboratories, Burlingame, U.K.) per 30 minuti a temperatura ambiente e la reazione è stata successivamente rilevata con diaminobenzidina (DAB; DAB Peroxidase Substrate Kit - Vector Laboratories, Burlingame, U.K.), utilizzata come cromogeno. Tra un passaggio e l'altro, sono stati effettuati ripetuti lavaggi delle sezioni in PBS a pH 6.8 ed i vetrini sono stati infine controcolorati con Ematossilina.

6.2.2 Immunoistochimica

Ai fini della valutazione delle cellule NE e dell'interazione stroma-epitelio, le sezioni sono state analizzate mediante immunoistochimica (IHC), utilizzando gli anticorpi ed applicando i protocolli di seguito descritti.

1. Cellule neuroendocrine: anticorpo monoclonale di topo anti-Serotonina umana (5-HT; Dako Cytomation, Denmark) ed anticorpo policlonale di coniglio anti-Cromogranina A umana (ChrA; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, U.S.). Sezioni consecutive, dello spessore di 4 μm , sono state mantenute in stufa a 37°C per 12 ore. A seguito di sparaffinatura, reidratazione e preincubazione con perossido di idrogeno al 30% per 20 minuti, è stato effettuato un passaggio di smascheramento antigenico: per 5-HT è stata applicata tripsina pronta all'uso (vedi sopra), mentre per ChrA sono stati effettuati successivi passaggi in microonde a 750W, per un tempo complessivo di 20 minuti. Dopo lavaggi seriali in PBS a pH 7, le sezioni sono state incubate con i rispettivi anticorpi primari (entrambi a diluizione 1:50) per 30 minuti a temperatura ambiente, così come richiesto dall'Envision™ System (Dako Cytomation, Denmark), utilizzato come anticorpo secondario coniugato con perossidasi. Entrambe le reazioni sono state rivelate con DAB ed infine i vetrini controcolorati con Ematossilina. Come controlli positivi sono state utilizzate sezioni di pancreas di topo ed intestino di coniglio, rispettivamente per 5-HT e ChrA; come controllo negativo, una sezione di prostata ed uretra è stata invece incubata solo con PBS, in luogo del rispettivo anticorpo primario. Per ogni campione, il numero delle cellule NE positive alla 5-HT ed alla ChrA è stato valutato al microscopio ottico attraverso un semplice protocollo di conta cellulare su 25 campi, selezionati casualmente, ad ingrandimento di 40x: è stato calcolato il valore medio di cellule NE positive a 5-HT e ChrA per ogni animale e successivamente il valore medio \pm deviazione standard (DS) per il totale degli animali appartenenti al rispettivo

gruppo di trattamento o di controllo. La conta cellulare è stata effettuata con il programma d'analisi d'immagine *Image J* e per la successiva elaborazione statistica dei dati è stato utilizzato il programma statistico *GraphPad InStat 3* (*one-way* ANOVA con *test di Turkey-Kramer* per la comparazione di campioni multipli nell'esperimento E1; *unpaired t-test* con correzione di *Welch* per i gruppi dell'esperimento E2), considerando come statisticamente significativi valori di probabilità di $p < 0.05$. E' stata inoltre considerata la distribuzione delle cellule NE rispetto alle lesioni iperplastiche e/o metaplastiche.

2. Interazione stroma-epitelio. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi (Ab) primari:
- Ab policlonale di capra anti-FGF-7 umano (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.);
 - Ab monoclonale di topo anti-IL-1 α umana (BioSource International, Inc. - Invitrogen Corporation, California, U.S.);
 - Ab policlonale di coniglio anti-FGF-2 umano (Chemicon International, Inc. - Millipore Corporation, U.S.);
 - Ab policlonale di coniglio anti-IL-8 umana (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.);
 - Ab monoclonale di topo anti-FGF-R umano (Chemicon International, Inc. - Millipore Corporation, U.S.).

I protocolli immunistochemici applicati sono stati del tutto simili a quelli utilizzati per le cellule NE, ad eccezione di alcuni passaggi e di alcune differenze legate alle caratteristiche specifiche degli anticorpi o a problemi tecnici dei campioni.

Le sezioni, anche in questo caso dello spessore di 4 μm , sono state sparaffinate, reidratate ed incubate con perossido d'idrogeno 30% per 20 minuti; lo smascheramento antigenico con tripsina (10 minuti a 37°C), è stato effettuato solo per

gli anticorpi anti-FGF-2, anti-FGF-7 ed anti-IL-8 in quanto non richiesto per i restanti due.

Rispetto alla procedura applicata per 5-HT e ChrA, è stato a questo punto incluso un passaggio in ABC (vedi sopra) al fine di ridurre al minimo l'attività della biotina endogena, aumentando la specificità della reazione e conseguentemente eliminando il "rumore di fondo" che tendeva a presentarsi a livello delle sezioni. Con lo stesso scopo, per FGF-2 ed IL-8 il PBS a pH 7.4 utilizzato per effettuare i lavaggi tra un passaggio e l'altro è stato addizionato, fino all'incubazione con l'Ab secondario, con lo 0.1% di Tween 20 (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, U.S.); per IL-8, dopo l'incubazione con ABC, è stata inoltre inclusa l'incubazione delle sezioni in siero albumina bovina (BSA; Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, U.S.) allo 0.05% in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Le diluizioni d'uso degli anticorpi primari ed i rispettivi tempi di incubazione sono stati i seguenti:

- Ab anti-FGF-7: diluizione 1:50 - incubazione *overnight* per 18 ore a 4°C;
- Ab anti-IL-1 α : concentrazione 20 μ g/ml - incubazione 2 ore a 4°C per i campioni E2, *overnight* per 18 ore a 4°C per i campioni E1;
- Ab anti-FGF-2: diluizione 1:10000 - incubazione 2 ore a 4°C per i campioni E2, *overnight* per 18 ore a 4°C per i campioni E1;
- Ab anti-IL-8: concentrazione 0.7 μ g/ml - incubazione 2 ore a 4°C;
- Ab anti-FGF-R: diluizione 1:700 per i campioni E2, 1:500 per i campioni E1 - per entrambi incubazione di 2 ore a 4°C.

Come indicato, per alcuni anticorpi i campioni E1 hanno richiesto l'applicazione di un tempo di incubazione più lungo (FGF-2 ed IL-1 α) o di una minore diluizione d'uso dell'anticorpo (FGF-R) rispetto ai campioni E2: ciò come probabile conseguenza del maggior tempo di permanenza dei tessuti in formalina e quindi dell'azione denaturante di quest'ultima sull'espressione dell'antigene specifico, che ha perciò reso necessaria una modifica dei protocolli immunostochimici.

A seconda della specie in cui l'Ab primario era sviluppato, gli anticorpi secondari successivamente applicati sono stati:

- LSAB[®]+ System-HRP (Dako Cytomation, Denmark) per FGF-7, FGF-2 ed IL-8 - incubazione di complessivi 50 minuti (25 minuti per ciascuna delle due soluzioni costituenti il kit) a temperatura ambiente;

- Envision[™] System (Dako Cytomation, Denmark) per FGF-R ed IL-1 α - incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente.

Le reazioni sono state infine rivelate con cromogeno DAB e le sezioni controcolorate con Ematossilina.

Come controlli positivi sono state utilizzate sezioni di utero di coniglio per FGF-7 ed IL-1 α e di polmone di vitello per IL-8, mentre per FGF-2 e FGF-R il muscolo uretrale presente nelle stesse sezioni di prostata ha rappresentato il controllo interno; come controllo negativo, una sezione di prostata ed uretra è stata invece incubata solo con PBS, in luogo del rispettivo anticorpo primario.

La valutazione dell'espressione degli FGF e di FGF-R è stata effettuata mediante il programma d'analisi d'immagine *Image J*: per gli FGF la conta delle cellule stromali positive è stata fatta su 10 campi, selezionati casualmente nel tessuto ghiandolare di ciascun animale, ad ingrandimento di 40x, mentre per FGF-R sono stati considerati, per ogni campione, 5 campi ad ingrandimento di 40x a livello epiteliale ed altrettanti campi allo stesso ingrandimento a livello stromale; sono stati calcolati i valori medi per animale e quindi i valori medi \pm DS per gruppo sperimentale. Per la successiva elaborazione statistica dei dati è stato utilizzato il programma statistico *GraphPad InStat 3* (*one-way* ANOVA con *test di Turkey-Kramer* per la comparazione di campioni multipli nell'esperimento E1; *unpaired t-test* con correzione di *Welch* per i gruppi dell'esperimento E2), considerando come statisticamente significativi valori di probabilità di $p < 0.05$. La positività delle cellule alle IL è stata invece espressa come densità percentuale sul totale

delle cellule epiteliali, considerando 10 campi ad ingrandimento 40x per ogni campione, e ne è stata valutata l'intensità di marcatura.

E' stata inoltre considerata la distribuzione delle cellule positive agli anticorpi anti-FGF, -IL e -FGF-R rispetto alle lesioni iperplastiche e/o metaplastiche.

Capitolo 7

RISULTATI

7.1 ISTOCHIMICA

La valutazione delle sezioni in Ematossilina-Eosina (EE) ha rivelato la presenza di iperplasia uretrale e ghiandolare sia negli animali trattati con associazione estrogeni-androgeni (gruppi ET ed EB) sia negli animali trattati con solo boldenone (gruppo B), ma le lesioni erano caratterizzate da diversa distribuzione e gravità. Nei gruppi di controllo (C1 e C2) non è stata osservata la presenza di lesioni (Fig. 3, 4) né positività alla lectina BSI-B₄.

Il gruppo EB mostrava diffusa iperplasia, da moderata a grave (Fig. 5), ed ampie aree di severa metaplasia squamosa dell'epitelio uretrale (Fig. 6), mentre a livello ghiandolare entrambe le lesioni, pur mantenendo la stessa gravità, avevano una distribuzione solo focale o multifocale. La marcatura con lectina BSI-B₄ ha confermato la presenza della metaplasia squamosa osservata in EE (Fig. 7).

L'iperplasia prostatica ed uretrale degli animali appartenenti al gruppo ET era da lieve a moderata, a distribuzione focale o multifocale; la presenza di metaplasia squamosa era minima in entrambi gli epiteli ed è stata confermata, anche in questo caso, dalla positività alla lectina BSI-B₄.

Gli animali del gruppo B presentavano iperplasia lieve e diffusa o moderata e focale a livello dell'epitelio uretrale; solo lieve, focale o multifocale, a livello dell'epitelio ghiandolare. Inoltre, è stata osservata grave dilatazione tubulare, spesso associata ad ipersecrezione (Fig. 8), a distribuzione da multifocale a diffusa e di entità da moderata a severa, e la formazione di cisti o microcisti (Fig. 9). La metaplasia squamosa era assente.

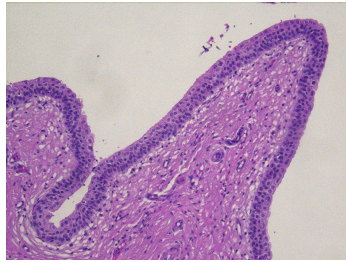


Fig. 3. Uretra normale (EE - 10x).

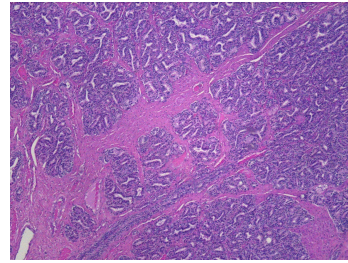


Fig. 4. Prostata normale (EE - 10x).

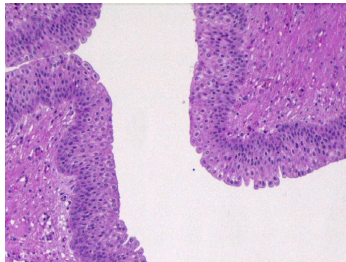


Fig. 5. Moderata iperplasia uretrale nel gruppo EB (EE - 20x).

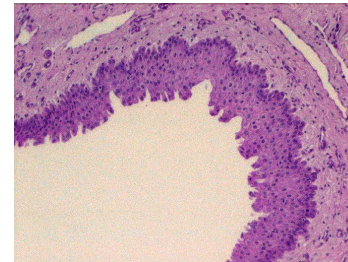


Fig. 6. Metaplasia squamosa uretrale nel gruppo EB (EE - 20x).

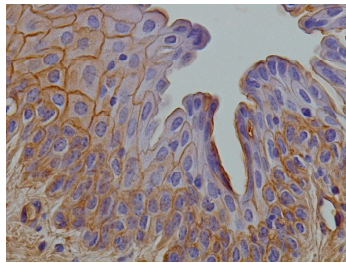


Fig. 7. Metaplasia squamosa uretrale marcata con lectina BSI-B₄ nel gruppo EB (40x).

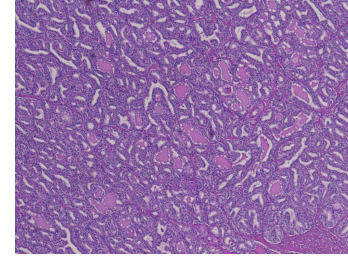


Fig. 8. Ipersecrezione a livello dell'epitelio ghiandolare nel gruppo B (EE - 40x).

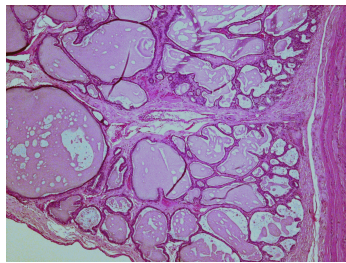


Fig. 9. Cisti a livello dell'epitelio ghiandolare nel gruppo B (EE - 10x).

7.2 IMMUNOISTOCHIMICA

7.2.1 Cellule neuroendocrine

La valutazione immunohistochimica delle sezioni con anticorpo anti-5-HT ed anticorpo anti-ChrA ha dato i seguenti risultati.

Uretra pelvica

A livello dell'uretra pelvica la popolazione più consistente era rappresentata dalle cellule NE immunoreattive alla 5-HT, mentre sono risultate meno numerose le cellule positive alla ChrA. Morfologicamente le cellule NE presentavano le tipiche caratteristiche descritte in letteratura (24,25).

I dati relativi al numero di cellule NE uretrali immunoreattive a 5-HT e ChrA nei diversi gruppi di trattamento (valore medio \pm DS), sia per l'esperimento E1 che per l'esperimento E2, sono riassunti in Tabella 1 e rappresentati graficamente nelle Figure 10 e 11.

	<u>5-HT</u>	<u>ChrA</u>
Gruppo C1	5,01 \pm 0,94	3,82 \pm 0,94
Gruppo ET	10,11 \pm 2,47	4,17 \pm 0,24
Gruppo EB	18,61 \pm 2,56	10,94 \pm 0,46
Gruppo C2	2,36 \pm 0,54	3,73 \pm 0,51
Gruppo B	4,68 \pm 0,16	3,41 \pm 0,93

Tabella 1. Valori medi \pm DS delle cellule NE uretrali, valutate sulla base della positività agli anticorpi anti-serotonina (5-HT) e anti-cromogranina A nei cinque gruppi sperimentali. Gruppo ET: estradiolo + testosterone; gruppo EB: estradiolo + boldenone; gruppo B: boldenone; gruppi C1, C2: animali di controllo.

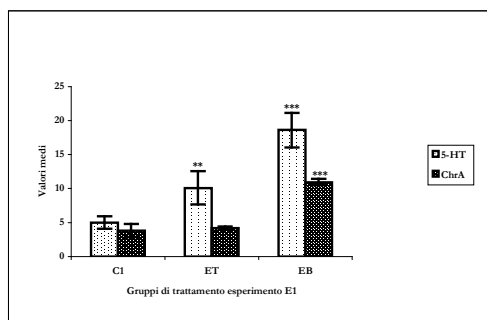


Figura 10. Rappresentazione grafica dei valori medi (\pm DS) delle cellule NE uretrali positive a 5-HT e ChrA nell'esperimento E1. Gruppo ET: estradiolo + testosterone (**p < 0,01 nel confronto con C1); gruppo EB: estradiolo + testosterone (***p < 0,001 nel confronto con C1); gruppo C1: controlli.

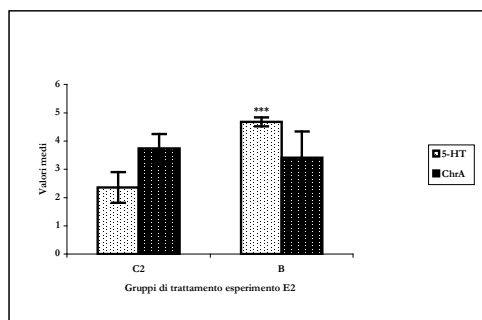


Figura 11. Rappresentazione grafica dei valori medi (\pm DS) delle cellule NE uretrali positive a 5-HT e ChrA nell'esperimento E2. Gruppo B: boldenone (***p < 0,001 nel confronto con C2); gruppo C2: controlli.

Relativamente alle cellule positive alla 5-HT, il loro numero ha mostrato un andamento in crescita dai controlli ai trattati: i valori medi (\pm DS) del gruppo ET erano doppi rispetto al gruppo C1, quelli del gruppo EB quasi quadrupli, se confrontati con lo stesso gruppo di controllo. L'analisi della varianza ha indicato che le differenze rilevate tra C1 ed ET erano statisticamente molto significative ($p < 0.01$), tra C1 ed EB erano altamente significative ($p < 0.001$) così come il confronto dei valori relativi ai due gruppi di trattamento ET ed EB tra di loro ($p < 0.001$).

Anche gli animali trattati (gruppo B) dell'esperimento E2 hanno mostrato un andamento simile rispetto al gruppo di controllo C2, presentando infatti un valore medio (\pm DS) di cellule NE positive alla 5-HT doppio rispetto ai controlli. Anche in questo caso la differenza tra i due gruppi, è risultata altamente significativa ($p < 0.001$).

E' stata inoltre osservata una differenza statisticamente significativa tra i valori medi (\pm DS) dei due gruppi di controllo C1 e C2.

Circa la distribuzione delle cellule NE, esse sono risultate essere più densamente distribuite in vicinanza delle lesioni iperplastiche (Figg. 12, 13, 14), mentre non è stata osservata alcuna relazione con le aree di metaplasia squamosa positive alla lectina BSI-B₄.

L'immunoreattività alla ChrA ha rivelato anche in questo caso un andamento in crescita dai controlli ai trattati, sebbene l'incremento sia risultato statisticamente significativo ($p < 0.001$) solo per il valore medio (\pm DS) del gruppo EB (Fig. 15), confrontato con quello del relativo gruppo di controllo C1 e del gruppo ET, e per gli animali del gruppo B, comparati con il rispettivo gruppo di controllo C2.

Per quanto riguarda la distribuzione delle cellule NE positive alla ChrA, solo raramente è stato osservato che esse fossero più densamente distribuite a livello delle aree iperplastiche nei gruppi sperimentali di trattamento.

Prostata

I dati ottenuti hanno indicato una minima presenza di cellule NE immunoreattive alla 5-HT ed alla ChrA nella prostata disseminata: esse erano sparse nell'epitelio ghiandolare o tra le cellule epiteliali dei dotti, senza significative differenze nei tre gruppi di trattamento e presentando solo raramente distribuzione associata alla localizzazione delle lesioni iperplastiche. Così come a livello uretrale, non è stata evidenziata alcuna relazione con le aree di metaplasia squamosa istochimicamente positive alla lectina BSI-B₄.

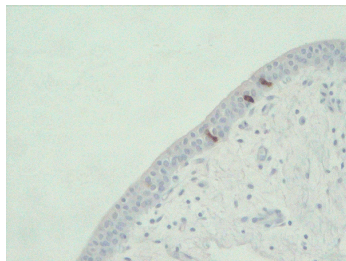


Fig. 12. Cellule NE uretrali nel gruppo di controllo C1 (5-HT - 10x).

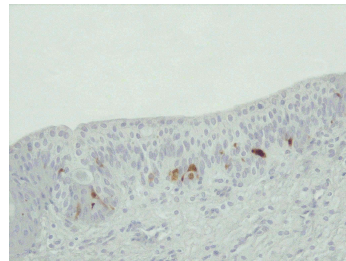


Fig. 13. Cellule NE uretrali nel gruppo ET (5-HT - 20x).

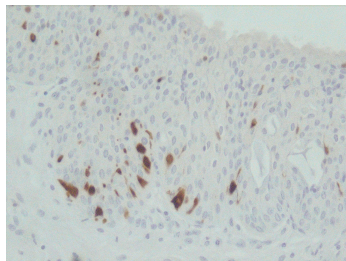


Fig. 14. Cellule NE uretrali nel gruppo EB (5-HT - 20x). E' possibile notarne la distribuzione in prossimità delle lesioni iperplastiche.

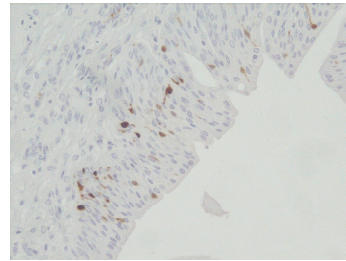


Fig. 15. Cellule NE uretrali nel gruppo EB (ChrA - 20x).

7.2.2 Interazione stroma-epitelio

I risultati di seguito elencati si riferiscono esclusivamente alla ghiandola prostatica poiché a livello uretrale è stata evidenziata solo una debole positività, e comunque non sempre specifica, a tutti gli anticorpi applicati.

7.2.2.1 FGF-7 e IL-1 α

- FGF-7: la marcatura con Ab anti-FGF-7 è risultata generalizzata e poco specifica sia a livello stromale che epiteliale ed in tutti i campioni appartenenti ai diversi gruppi sperimentali.

- IL-1 α : l'epitelio ghiandolare ha presentato una marcatura con Ab anti-IL-1 α non costante, essendo talvolta a distribuzione non omogenea, talvolta generalizzata e poco specifica, sia negli animali trattati che nei gruppi di controllo di entrambi gli esperimenti.

Conseguentemente, non è stato possibile applicare il protocollo di conta cellulare alle cellule stromali ed epiteliali positive per FGF-7, né calcolare la densità di cellule epiteliali immunoreattive all'IL-1 α .

7.2.2.2 FGF-2 e IL-8

- FGF-2: la marcatura con anticorpo anti-FGF-2 è risultata sensibile e specifica sia a livello stromale che epiteliale (Figg. 16, 17, 18). I dati derivanti dalla conta cellulare delle cellule stromali ed epiteliali positive per FGF-2 sono riassunti in Tabella 2 e rappresentati graficamente nelle Figg. 19, 20.

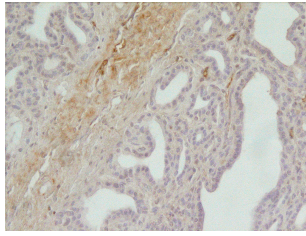


Figura 16. Espressione di FGF-2 a livello stromale ed epiteliale nel gruppo C1 (20x).

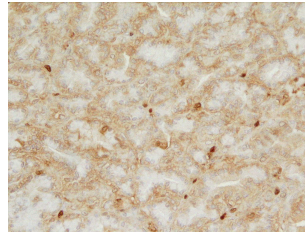


Figura 17. Espressione di FGF-2 a livello stromale ed epiteliale nel gruppo B (20x).

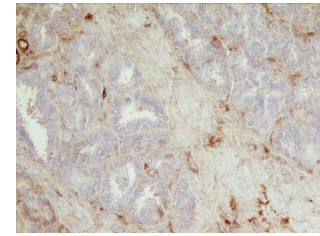


Figura 18. Espressione di FGF-2 a livello stromale ed epiteliale nel gruppo EB (20x).

	FGF-2 stromale	FGF-2 epiteliale
Gruppo C1	10,18 ± 1,57	1,89 ± 1,15
Gruppo ET	14,66 ± 2,82	2,14 ± 0,97
Gruppo EB	14,63 ± 2,54	3,37 ± 0,80
Gruppo C2	10,35 ± 3,54	1,25 ± 1,22
Gruppo B	20,81 ± 3,09	3,45 ± 0,68

Tabella 2. Valori medi ± DS delle cellule positive per anticorpo anti-FGF-2 a livello stromale e a livello epiteliale nei cinque gruppi sperimentali. Gruppo ET: estradiolo + testosterone; gruppo EB: estradiolo + boldenone; gruppo B: boldenone; gruppi C1, C2: animali di controllo.

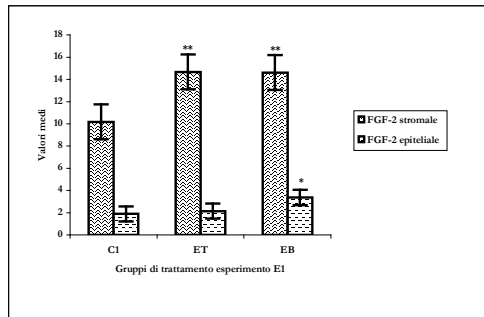


Figura 19. Rappresentazione grafica dei valori medi (± DS) delle cellule stromali ed epiteliali positive ad anticorpo anti FGF-2 nell'esperimento E1. Gruppo ET: estradiolo + testosterone (**p < 0.01 nel confronto con C1); gruppo EB: estradiolo + testosterone (**p < 0.001 nel confronto con C1); gruppo C1: controlli.

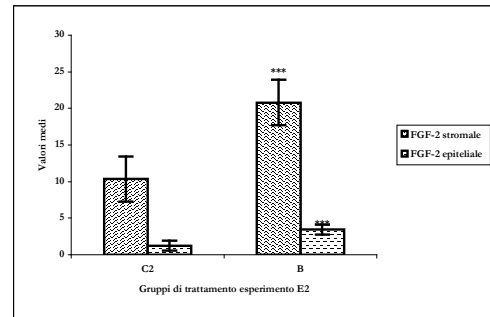


Figura 20. Rappresentazione grafica dei valori medi (± DS) delle cellule stromali ed epiteliali positive ad anticorpo anti FGF-2 nell'esperimento E2. Gruppo B: boldenone (**p < 0.001 nel confronto con C2); gruppo C2: controlli.

Stroma

Relativamente all'esperimento E1, la comparazione tra i tre gruppi sperimentali ha indicato che l'incremento del valore medio (± DS) di cellule stromali positive per

FGF-2 nei gruppi EB ed ET rispetto al gruppo C1 era statisticamente molto significativo ($p < 0.01$), mentre i valori erano praticamente equivalenti tra EB ed ET e la differenza non statisticamente significativa.

Una differenza ancora più evidente è stata osservata tra gli animali trattati con solo boldenone (gruppo B) rispetto ai controlli C2: il valore medio (\pm DS) era infatti doppio ($20.81 \pm 3,09$) di quello relativo agli animali non trattati ($10,35 \pm 3,54$).

Circa la distribuzione delle cellule positive per FGF-2, esse sono risultate essere maggiormente espresse a livello dei piccoli tralci intraghiandolari di tessuto connettivo, quindi in stretta vicinanza con gli acini ghiandolari, mentre erano del tutto assenti nell'abbondante stroma che circonda l'uretra.

Epitelio

La marcatura a livello epiteliale era minima o assente nei gruppi di controllo di entrambi gli esperimenti; anche per il gruppo di trattamento ET un limitato numero di cellule ha presentato positività a FGF-2, mentre i valori medi (\pm DS) calcolati nei gruppi cui era stato somministrato boldenone, in associazione ad estrogeni o da solo (EB, B), hanno evidenziato una maggiore espressione epiteliale ed un andamento simile, se confrontati con i rispettivi gruppi di controllo (C1, C2). Solo in questo caso, inoltre, le differenze nella comparazione con i controlli erano statisticamente significative ($p < 0.05$).

Le osservazioni effettuate riguardo alla distribuzione delle cellule epiteliali immunoreattive all'Ab anti-FGF-2 rispetto alle lesioni iperplastiche e/o metaplastiche hanno evidenziato che tali cellule, presenti comunque in numero esiguo, tendevano ad essere preferibilmente localizzate nelle aree periferiche della ghiandola, mantenendo comunque una distribuzione complessivamente omogenea tra le aree iperplastiche e quelle morfologicamente normali.

- IL-8: l'espressione di IL-8 a livello delle cellule epiteliali ha mostrato un andamento simile nelle aree morfologicamente normali ed in quelle caratterizzate dalla presenza di

lesioni iperplastiche e/o metaplastiche. La densità percentuale media (numero di cellule positive per IL-8/numero totale di cellule epiteliali \times 100) nei singoli gruppi sperimentali è risultata la seguente:

- gruppo C1: 35%;
- gruppo ET: 60%;
- gruppo EB: 70%;
- gruppo C2: 30%;
- gruppo B: 65%.

Negli stessi campi considerati per il calcolo delle densità, è stata contemporaneamente valutata l'intensità di marcatura delle cellule che esprimevano IL-8: rispetto agli animali di controllo (C1, C2) ed alle aree morfologicamente normali degli animali trattati, nei campioni appartenenti ai gruppi ET, EB e B, a livello delle aree di iperplasia ghiandolare, è stata osservata una marcatura epiteliale più intensa ed omogenea, che ha permesso di evidenziare in modo specifico le stesse lesioni, anche quando di lieve entità (Figg. 21, 22, 23). Marcatura analoga, e talvolta addirittura più intensa, caratterizzava inoltre alcune singole cellule epiteliali con ampio citoplasma e preferenzialmente localizzate a livello acinare o duttale nelle regioni periferiche della ghiandola (Fig. 24). Relativamente alla distribuzione delle cellule marcate con Ab anti-IL-8, i dati concordavano con la distribuzione delle lesioni osservate sulle stesse sezioni in EE. Non è stata invece individuata alcuna relazione con le aree di metaplasia squamosa marcate con lectina BSI-B₄.

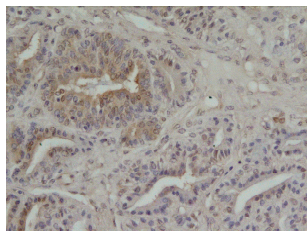


Figura 21. Area di moderata iperplasia prostatica marcata con IL-8 nel gruppo ET (20x).

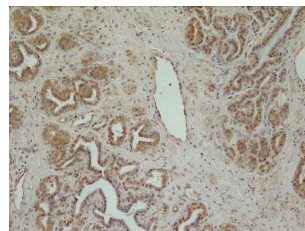


Figura 22. Quadro di grave iperplasia prostatica marcata con IL-8 nel gruppo EB (10x).

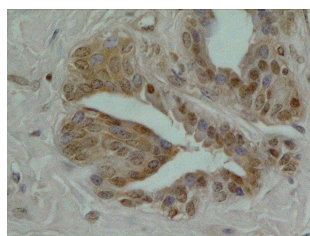


Figura 23. Area di grave iperplasia prostatica marcata con IL-8 nel gruppo EB (40x).

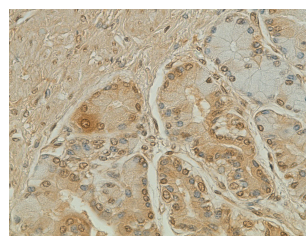


Figura 24. Singola cellula epiteliale marcata con IL-8 a livello della regione periferica della prostata (20x).

7.2.2.3 FGF-R

Da premettere che la valutazione dell'espressione degli FGF-R è stata possibile solo per l'esperimento E2, a causa della mancata marcatura dei campioni derivanti dall'esperimento E1.

I valori medi (\pm DS) dei gruppi B e C2, derivanti dalla conta cellulare delle cellule stromali ed epiteliali positive per FGF-R, sono riassunti in Tabella 3 e rappresentati graficamente in Figura 25.

Le Figure 26 e 27 mostrano come la marcatura epiteliale, stromale ed endoteliale sia risultata sensibile e specifica per entrambi i gruppi sperimentali.

L'analisi della varianza tra controlli e trattati ha indicato una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) per l'espressione stromale degli FGF-R e molto significativa per l'espressione epiteliale ($p < 0.01$) degli stessi.

Per quanto concerne la distribuzione delle cellule positive all'Ab anti-FGF-R, esse si presentavano distribuite in modo diffuso ed omogeneo a livello sia stromale che epiteliale, senza significative differenze osservabili tra le aree iperplastiche e/o metaplastiche e le aree morfologicamente normali.

	FGF-R epiteliale	FGF-R stromale
Gruppo C2	41,44 ± 4,64	20,76 ± 3,34
Gruppo B	83,20 ± 13,02	27,23 ± 4,05

Tabella 3. Valori medi ± DS delle cellule positive per anticorpo anti-FGF-R a livello epiteliale e a livello stromale nell'esperimento E2. Gruppo B: boldenone; gruppo C2: animali di controllo.

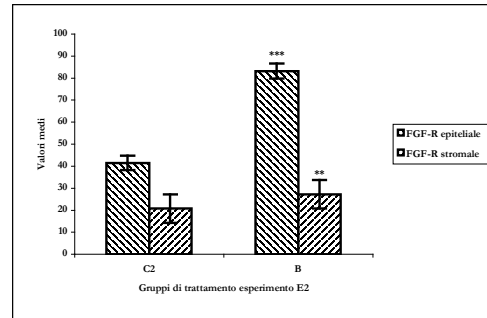


Figura 25. Rappresentazione grafica dei valori medi (± DS) delle cellule epiteliali e stromali positive ad anticorpo anti FGF-R nell'esperimento E2. Gruppo B: boldenone (**p < 0.01 e ***p < 0.001 nel confronto con C2); gruppo C2: controlli.

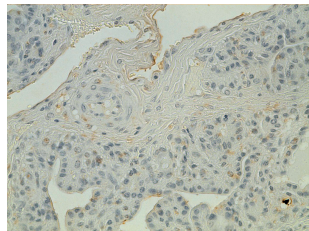


Figura 26. Espressione prostatica di FGF-R nel gruppo C2 (40x).

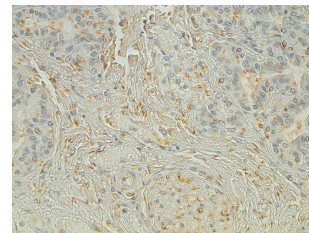


Figura 27. Espressione prostatica di FGF-R nel gruppo B (40x).

Capitolo 8

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nell'allevamento del bovino da carne, la somministrazione di steroidi sessuali a scopo anabolizzante si sospetta essere una pratica tuttora largamente diffusa in molti Paesi europei. I promotori di crescita illegalmente impiegati in zootecnia hanno come fine ultimo quello di determinare lo sviluppo della fibra muscolare e la diminuzione del grasso di deposito, ma nel contempo provocano gravi alterazioni a carico di specifici organi che, fisiologicamente stimolati dalle sostanze impiegate, rappresentano i veri e propri organi bersaglio delle stesse. L'evoluzione nelle strategie di trattamento cui si è assistito dagli anni '80 ad oggi ha reso però progressivamente più difficile l'individuazione di quei parametri che consentissero di riconoscere gli animali trattati, sia in vita che dopo la macellazione. L'associazione di più molecole tra loro, ciascuna somministrata in dosi ridotte, o l'impiego di sostanze diverse, o comunque modificate e caratterizzate da rapida metabolizzazione ed eliminazione, hanno infatti determinato l'attenuazione o la scomparsa delle classiche lesioni riconducibili a trattamento, nonché la difficoltà ad individuare chimicamente i residui delle sostanze somministrate. Sul piano del controllo ufficiale viene sistematicamente effettuato il prelievo di tessuti e materiale biologico per le indagini chimiche quali-quantitative, ma è stata recentemente rivalutata l'importanza dell'esame istopatologico quale metodo di *screening*, ad elevata sensibilità e ripetibilità, in grado di rilevare quelle modificazioni che permangono negli organi bersaglio per un tempo sufficientemente lungo da poter essere ancora svelate al momento della macellazione ^(1,2,3,4,5,6,7,8,9). Gli organi principalmente significativi ai fini dell'individuazione degli animali trattati con ormoni steroidei sessuali sono la prostata e l'annessa uretra pelvica: su di essi l'azione estrogenica si manifesta tipicamente con iperplasia e metaplasia squamosa a carico degli epitelii, mentre gli androgeni, pur

mantenendo un effetto iperplastico sugli stessi, determinano primariamente dilatazione tubulare ed ipersecrezione e la possibile formazione di cisti o microcisti a livello ghiandolare (5,7,8,9,10). La routinaria attività veterinaria di monitoraggio su animali regolarmente macellati e destinati al consumo umano, ha reso però evidente come anche i quadri istopatologici appena descritti a carico dei suddetti organi bersaglio degli ormoni steroidei sessuali siano andati progressivamente modificandosi o attenuandosi. In luogo delle più conclamate e specifiche lesioni di tipo metaplastico, la lesione che negli ultimi anni ha continuato a presentarsi in modo costante, seppure a gravità variabile, a carico del complesso uretro-prostatico bovino è stata infatti l'iperplasia/ipertrofia degli epitelii; non sono inoltre di frequente osservazione quadri di grave dilatazione tubulare ed ipersecrezione, ma piuttosto la presenza di cisti o più spesso microcisti nel tessuto ghiandolare. E' diventata altresì sempre più evidente la marcata diversità di comportamento tra prostata ed uretra in risposta ai trattamenti ormonali, a sua volta come probabile esito del modificarsi delle strategie di trattamento e della somministrazione di sostanze diverse o comunque diversamente associate tra loro.

Partendo da tali rilievi, e facendo riferimento ai numerosi studi condotti in medicina umana sull'iperplasia prostatica benigna (BPH), si è voluto dunque indagare sul possibile meccanismo patogenetico alla base dello sviluppo dell'iperplasia prostatica ed uretrale bovina indotta da somministrazione di ormoni steroidei sessuali, con lo scopo di poterne meglio interpretare il significato negli animali sospetti di trattamento. Le indagini su cui si è concentrata l'attenzione sono state quelle relative al ruolo ed al significato delle cellule neuroendocrine (NE) e dell'interazione stroma-epitelio quali possibili fattori coinvolti nella patogenesi della BPH (11,12,15,16,17,18).

I campioni considerati nel presente studio provenivano da esperimenti effettuati negli anni 2003-2004 e ciò ha determinato non pochi problemi tecnici nella gestione degli stessi ai fini della loro valutazione immunoistochimica. Il prolungato tempo di permanenza dei tessuti in formalina e quindi l'azione denaturante di quest'ultima

sull'espressione degli antigeni specifici ha spesso reso necessaria una modifica dei protocolli immunoistochimici per l'applicazione di alcuni anticorpi, ma talvolta non ha purtroppo permesso di trovare alcun riscontro nell'analisi immunoistochimica.

Lo studio è stato sviluppato su campioni appartenenti a vitelli a carne bianca in quanto categoria merceologica più frequentemente coinvolta nella pratica del trattamento a scopo anabolizzante, sia in relazione alla tipologia ed alle tempistiche di allevamento sia per quanto rilevato attraverso la quotidiana attività di controllo svolta per aziende private o nell'ambito di piani di monitoraggio regionale. Inoltre, la scelta di considerare tre diverse tipologie di trattamento (gruppo ET: 17β -estradiolo + testosterone; gruppo EB: 17β -estradiolo + boldenone; gruppo B: boldenone) è stata effettuata per verificare se ed in che modo i diversi ormoni o le differenti combinazioni di ormoni influissero sui possibili meccanismi patogenetici alla base dell'iperplasia uretro-prostatica bovina indotta da somministrazione di steroidi sessuali.

Alla valutazione preliminare dei campioni in EE, è risultata evidente la presenza di aspetti istopatologici a gravità ed estensione variabile nei tre gruppi sperimentali di trattamento, confermando essenzialmente quanto riportato in letteratura (4,8,9,33,38,41).

E' noto che la somministrazione di estrogeni, come effetto primario sull'epitelio uretrale e ghiandolare, determini la comparsa di grave e diffusa iperplasia e metaplasia squamosa a carico degli epitelii ghiandolare ed uretrale (1,3,6): l'esame dei campioni provenienti dagli esperimenti E1 ed E2, ha permesso di considerare che quando gli estrogeni sono associati a testosterone (gruppo ET) le lesioni iperplastiche e metaplastiche sugli epitelii si attenuano, diventando di entità lieve o moderata, mentre quando la somministrazione di estrogeni avviene in associazione a boldenone (gruppo EB), si mantiene un grave effetto iperplastico e metaplastico sugli stessi, ma compaiono altresì cisti e microcisti focali a livello ghiandolare. Per quanto riguarda invece la somministrazione di boldenone (gruppo B), esso determina solo la comparsa di lievi lesioni iperplastiche e metaplastiche sia nella prostata che nell'uretra, ma

tipicamente induce grave dilatazione tubulare e la costante formazione di cisti e microcisti, a distribuzione multifocale o diffusa a livello dell'epitelio ghiandolare.

L'esame delle sezioni incubate con lectina BSI-B₄ ha mostrato una marcatura sensibile e specifica delle cellule in metaplasia squamosa, confermando le lesioni osservate in EE e dando un contributo essenziale e discriminante all'interpretazione delle stesse, soprattutto quando allo stadio iniziale.

I risultati ottenuti dalla valutazione delle cellule NE hanno suggerito che esse risentono della somministrazione di ormoni steroidei sessuali sia in termini di numerosità che di distribuzione, rispondendo però a loro volta in modo diverso alle tipologie di trattamento applicate. Analizzandone numero e distribuzione nei cinque gruppi sperimentali, i risultati ottenuti hanno evidenziato la netta influenza del 17 β -estradiolo su di esse, in modo particolare sulla popolazione positiva alla 5-HT ed a localizzazione uretrale, confermando innanzitutto il ruolo fondamentale svolto dagli estrogeni nello sviluppo dell'iperplasia uretrale, ma indicando anche il primario coinvolgimento delle cellule immunoreattive alla 5-HT, rispetto a quelle positive alla ChrA, nella sua patogenesi. Inoltre, le differenze evidenziate tra i gruppi ET ed EB, con un valore medio più alto nel gruppo EB, hanno indicato come il boldenone abbia, rispetto al testosterone, un'azione più permissiva nei confronti degli estrogeni, determinando conseguentemente una maggiore espressione delle cellule NE e confermando le osservazioni derivanti dall'analisi morfologica delle stesse sezioni già in EE e con lectina BSI-B₄. Per quanto riguarda il gruppo B, i valori medi ottenuti dalla valutazione delle cellule NE uretrali hanno mostrato una debole influenza del boldenone sulle cellule NE immunoreattive alla 5-HT e nessuna influenza sull'espressione delle cellule NE positive alla ChrA, per le quali la differenza con il relativo gruppo di controllo C2 è risultata infatti statisticamente non significativa ($p > 0.05$).

Anche considerando la distribuzione delle cellule NE rispetto alle lesioni osservate è stato possibile confermare che la popolazione di cellule NE maggiormente sensibile alla somministrazione di steroidi sessuali, ed in particolare di estrogeni, nonché

maggiormente coinvolta nello sviluppo dell'iperplasia, è quella 5-HT positiva e solamente a livello uretrale; non è stata invece osservata la stessa relazione per le lesioni di tipo metaplastico, né in generale a livello della ghiandola prostatica. Confrontando i dati ottenuti dal presente studio con quelli riportati per la BPH, è possibile supporre che esista quindi una maggiore similarità di comportamento tra l'iperplasia prostatica umana e quella uretrale, piuttosto che ghiandolare, di bovino. Ciò è però con ogni probabilità da riferirsi al tipo di campione considerato, dal momento che non sono state analizzate sezioni di corpo prostatico bensì di prostata disseminata, nel cui epitelio è nota la presenza di un numero esiguo di cellule NE ⁽²⁴⁾.

Un altro dato da considerare è la differenza evidenziata tra i valori medi di cellule NE 5-HT-positive nei due gruppi di controllo C1 e C2: tale popolazione cellulare è risultata essere quella maggiormente implicata nello sviluppo dell'iperplasia, ma, facendo riferimento agli studi condotti in medicina umana ^(11,15,23,49,53), si può supporre che essa intervenga nell'accrescimento e nella proliferazione cellulare del complesso uretro-prostatico già in condizioni normali. La discrepanza osservata si può quindi spiegare sia con il fatto che gli animali dei due esperimenti appartenevano a razze diverse, che fisiologicamente presentano specifiche e differenti caratteristiche di precocità, sia dall'età di macellazione degli animali: i vitelli dell'esperimento E1, il cui gruppo di controllo ha presentato il valore medio più elevato, sono stati infatti macellati a 8 mesi di età, mentre quelli appartenenti all'esperimento E2 a 6 mesi di età con conseguenti ulteriori implicazioni nel grado di sviluppo del complesso prostatico.

Per quanto riguarda l'interazione stroma-epitelio, i dati verranno discussi considerando parallelamente i risultati relativi all'espressione del fattore di crescita fibroblastica e quelli inerenti alla rispettiva interleuchina, per i quali è stata di fatto valutata l'eventuale specifica interazione. Da segnalare, inoltre, che essi si riferiscono esclusivamente all'analisi della ghiandola prostatica, in quanto a livello uretrale è stata evidenziata solo una debole positività, e comunque non sempre specifica, a tutti gli anticorpi applicati.

Come già indicato nel capitolo dei risultati, la valutazione immunohistochimica delle sezioni non è stata possibile né per FGF-7 né per l'IL-1 α . Essendo entrambi coinvolti, inizialmente si è stati portati a pensare ad una loro mancata espressione nel bovino, con conseguenti implicazioni anche rispetto alla loro possibile interazione nella patogenesi delle lesioni iperplastiche. Sono state perciò eseguite ripetute prove, che hanno incluso la modifica dei protocolli immunohistochimici e l'applicazione di più Ab tra quelli disponibili in commercio per l'utilizzo su tessuti in paraffina, ma ne è risultata comunque un'evidente cross-reattività anticorpale ed un'aspecificità di marcatura che hanno quindi indicato come ci si trovasse piuttosto di fronte a problemi tecnici legati all'anzianità dei campioni e che ciò fosse alla base del mancato ottenimento di dati attendibili circa l'espressione dei fattori in esame. A dare parziale conferma di questo anche i risultati relativi all'espressione recettoriale per gli FGF, che verranno esposti e commentati successivamente.

I dati ottenuti dalla valutazione dell'immunoreattività delle sezioni di prostata disseminata all'Ab anti-FGF-2, hanno innanzitutto indicato un'espressione sia stromale che epiteliale di tale fattore, riproponendone quindi le caratteristiche descritte nella prostata umana. Per quanto riguarda l'espressione epiteliale, essa è risultata minima nei controlli di entrambi gli esperimenti e nel gruppo ET, mentre era significativamente più alta negli animali a cui, da solo o in associazione ad estrogeni, fosse stato somministrato boldenone (gruppi B ed EB), con una minima prevalenza nel caso della somministrazione di solo boldenone; la sua espressione stromale si è presentata in modo nettamente più consistente in tutti i gruppi sperimentali, mostrando lo stesso andamento in crescita rispetto ai controlli nei gruppi EB ed ET, ed un netto distacco in aumento del gruppo B. Tutto ciò fa considerare, come prima cosa, che l'effetto prevalente sull'espressione prostatica di FGF-2 sia quello del boldenone, come dimostra il fatto che i valori medi di cellule stromali ed epiteliali positive per FGF-2 erano significativamente maggiori ($p < 0.01$) nel gruppo B; i dati ottenuti nei gruppi di trattamento ET ed EB indicano inoltre come nel comparto stromale, propria area di

espressione di FGF-2, boldenone e testosterone, entrambi androgeni, probabilmente si appoggino agli stessi percorsi biochimici intracellulari e che, contrastati dalla presenza degli estrogeni, risultino infine in una minore marcatura ad FGF-2. A livello epiteliale, mentre si conferma l'antagonismo estrogeni-testosterone fino al punto di non avere differenze di espressione tra C ed ET, si osserva invece un minore antagonismo tra estrogeni e boldenone. Quest'ultimo dato concorda con l'osservazione dello sviluppo delle lesioni epiteliali in EE, dove si era notata proprio una permissività del boldenone nei confronti degli estrogeni e, per contro, un evidente antagonismo del testosterone contro gli stessi.

Significativa anche la distribuzione delle cellule positive per FGF-2 le quali, sia a livello stromale che epiteliale ed in tutti i gruppi sperimentali, tendevano a localizzarsi in stretta vicinanza con gli acini ghiandolari e preferibilmente nelle regioni periferiche della prostata: è questa infatti la porzione ghiandolare in cui più frequentemente si osserva la comparsa di iperplasia e dove comunque la ghiandola tende ad andare più rapidamente incontro a maturazione. Ciò va quindi a confermare ulteriormente il coinvolgimento di FGF-2 nel processo di proliferazione epiteliale e stromale, che si verifica fisiologicamente nella normale crescita prostatica così come nello sviluppo delle lesioni iperplastiche.

Considerazioni analoghe a FGF-2 possono essere fatte circa l'andamento dell'espressione dell'IL-8 nei cinque gruppi sperimentali: l'aumento della densità percentuale di cellule immunoreattive all'Ab anti-IL-8 osservato dai controlli ai trattati, e le differenze, seppur minime, determinate dalla somministrazione delle diverse combinazioni ormonali portano infatti a trarre conclusioni sovrapponibili a quanto precedentemente esposto per FGF-2, sia circa l'influenza del boldenone che per quanto riguarda la conferma del coinvolgimento di tale fattore nella patogenesi delle lesioni iperplastiche. Un'ulteriore osservazione da fare riguarda invece la marcatura più intensa all'anticorpo anti-IL-8 evidenziata non solo a livello delle aree iperplastiche, ma anche di alcune singole cellule epiteliali: viste le caratteristiche morfologiche e la

localizzazione di tali cellule prevalentemente nelle regioni periferiche della ghiandola dove più spesso si osserva la comparsa di iperplasia, una possibile spiegazione del loro significato funzionale è che esse siano le cellule da cui parte il segnale iperplastico e da cui abbiano quindi inizio le modificazioni implicate nella successiva progressione del fenomeno.

Relativamente all'espressione degli FGF-R, anche in questo caso ne è stata confermata la localizzazione stromale, epiteliale ed endoteliale descritta nell'uomo. I valori medi calcolati nei gruppi di controllo e di trattamento dell'esperimento E2 hanno inoltre indicato, similmente a quanto evidenziato per FGF-2, una netta influenza del boldenone sulla loro espressione sia a livello stromale che a livello epiteliale. Facendo riferimento ai dati relativi alla prostata umana, il fatto che nei controlli il valore medio epiteliale sia risultato doppio rispetto a quello stromale è presumibilmente dovuto alla localizzazione epiteliale sia dei recettori per FGF-2 che per FGF-7, contro l'espressione stromale dei soli recettori per FGF-2. Non si possono però fare considerazioni certe in questo senso poiché purtroppo l'Ab utilizzato per il presente studio non permetteva di distinguere tra i due specifici recettori, andando contemporaneamente a marcare entrambi. Ulteriore conferma a questa ipotesi, ed in concordanza con l'osservazione precedentemente esposta sull'influenza del boldenone nei confronti della ghiandola prostatica, dovrebbe comunque derivare dal fatto che i valori medi epiteliali negli animali trattati erano addirittura quasi triplicati rispetto a quelli stromali dello stesso gruppo di trattamento. Come precedentemente accennato nell'ambito della discussione su FGF-7 ed IL-1 α , tali dati confermano inoltre che la marcatura aspecifica e non significativa risultata in tutti i campioni all'applicazione dei rispettivi Ab sia stata di fatto determinata da problemi tecnici legati ai campioni e non dalla mancata espressione dei suddetti fattori, o quantomeno di FGF-7, nella prostata bovina. Altro dato mancante, sempre in relazione ai problemi tecnici presentati dai campioni, è purtroppo la valutazione dell'espressione degli FGF-R negli animali dell'esperimento

E1 e quindi il confronto tra i possibili effetti indotti dalle diverse tipologie di trattamento.

Andando a concludere, si può quindi affermare che lo studio condotto ha fornito indicazioni importanti circa il possibile meccanismo patogenetico dell'iperplasia prostatica ed uretrale bovina indotta da trattamento ormonale, ma ha anche apportato nuovi contributi per l'interpretazione delle lesioni osservate.

Le cellule NE uretrali subiscono infatti l'effetto dei trattamenti ormonali e sono particolarmente influenzate dall'azione degli estrogeni, che ne determinano un evidente aumento in termini numerici; tra le due popolazioni cellulari, analogamente a quanto indicato per la BPH, quella maggiormente sensibile e quindi maggiormente coinvolta nello sviluppo dell'iperplasia è risultata quella immunoreattiva alla 5-HT. Il fatto che quest'ultima sia risultata più densamente distribuita in prossimità delle lesioni iperplastiche andrebbe inoltre a dare conferma di un suo ruolo fondamentale nella patogenesi dell'iperplasia uretrale.

Nell'uomo è stato osservato che il numero di cellule NE aumenta solo nelle forme precoci di BPH, mentre la loro densità tende a diminuire a livello dei noduli iperplastici maturi: nel bovino l'iperplasia indotta da steroidi sessuali non arriva mai allo stadio nodulare più avanzato ed i dati acquisiti nel nostro studio rispetto alla numerosità ed alla distribuzione delle cellule NE trovano quindi anche in questo caso concordanza con le osservazioni effettuate nell'uomo.

Per quanto riguarda la ghiandola, si può affermare che come nell'uomo anche nel bovino sussista l'interazione tra FGF-2 ed IL-8 e che anche l'espressione recettoriale per gli FGF sia coinvolta nel fenomeno iperplastico: visto l'andamento dei dati ottenuti, è inoltre possibile dire che l'effetto prevalente sulle modificazioni a livello prostatico sia quello del boldenone, seppure, e come prevedibile, non completamente disgiunto dalla contemporanea azione degli estrogeni. Sebbene ciò sembri in contrasto con la distribuzione e l'entità dell'iperplasia osservata negli animali trattati con boldenone, in realtà suggerisce come l'interazione stroma-epitelio intervenga

primariamente nelle fasi iniziali del suo sviluppo e proprio a questo stadio risultino quindi più evidenti le alterazioni di espressione dei fattori coinvolti.

Quanto fin qui esposto fornisce dati importanti anche circa il diverso comportamento di prostata ed uretra in risposta ai trattamenti ormonali: se infatti l'uretra è risultata maggiormente influenzata dalla somministrazione di estrogeni e lo sviluppo delle lesioni iperplastiche a suo carico sembrerebbe dipendere dall'effettivo coinvolgimento delle cellule NE, a livello della prostata disseminata l'azione degli androgeni è risultata invece quella maggiormente implicata nella modulazione del fenomeno iperplastico, quantomeno nelle sue prime fasi di sviluppo, e sarebbe l'interazione stroma-epitelio a svolgere un ruolo fondamentale nel suo meccanismo patogenetico.

Capitolo 9

BIBLIOGRAFIA

1. Kroes R., Berkvens J.M., Loendersloot H.J., Ruitenbergh E.G. - *Oestrogen-induced changes in the genital tract of the male calf*. Zbl. Vet. Med., Reihe A (1971); 18: 717-730.
2. Gropp J. et al. - *Effect of 17-beta-oestradiol and trenbolone acetate in different doses on several physiological and morphological parameters (provocation trial)*. Fortschritte in der Tierphysiologie und Tiernahrung (1976); 6: 33-52.
3. Schaudinn B. et al. - *Detecting the use of oestrogens in calves by histological means*. Fleischwirtschaft (1977); 57(9): 1664-1668.
4. Grandmontagne C. - *Modifications histologiques de la prostate du veau traité par les différents anabolisants utilisés en élevage*. Revue de Médecine Vétérinaire (1986) ; 137(1): 37-47.
5. Groot M.J. et al. - *Histological changes in the prostate of veal calves after the administration of natural hormones*. Arch. Lebensmittelhyg (1990); 41: 37-42.
6. Groot M.J., Ossenkoppele J.S., Bakker R., Pfaffl M.W., Meyer H.H., Nielen M.W. - *Reference histology of veal calf genital and endocrine tissue – an update for screening on hormonal growth promoters*. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. (Giugno 2007); 54 (5): 238-46.
7. Groot M.J. et al. - *Histological examination for detecting hormone use, a trial on veal calves*. Tijdschrift voor Diergeneeskunde (1989); 114(6): 315-321.
8. Groot M. J. Et al. - *Changes in cytokeratine expression in accessory sex glands of growth promoter treated veal calves: influences of treatment schedule and combination of drugs*. European Journal of Veterinary Pathology (2000); 6(1):19-24.
9. Groot M.J., Schilt R., Ossenkoppele J.S., Berende P.L., Haasnoot W. - *Combination of growth promoters in veal calves: consequences for screening and confirmatio methods*. Zentralbl. Veterinarmed A. (Settembre 1998); 45(6-7): 425-40.
10. Groot M.J., Biolatti B. - *Histopathological effects of boldenone in cattle*. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. (Marzo 2004); 51(2): 58-63.

11. Xue Y., Smedts F., Verhofstad A., Debruyne F., De la Rosette J., Schalken J. - *Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship : new perspectives.* Prostate Suppl. (1998); 8: 62-73.
12. Peehl D.M. - *Cellular biology of prostatic growth factors.* Prostate Suppl. (1996); 6: 74-8.
13. Bonkhoff H., Remberger K. - *Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model.* Prostate (Febbraio 1996); 28(2): 98-106.
14. Xue Y., Smedts F., Debruyne F., De la Rosette J., Schalken J. - *Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate.* Prostate (1998); 34: 292-301.
15. Abraham T.K., Cockett M.D., P. Anthony Di Sant'Agnese M.D., Prabhu Gopinath D., Susan R. Schoen B.S., P. A. Abrahamsson M.D. - *Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia.* Urology (Novembre 1993); 42(5): 512-19.
16. Islam M.A., Kato H., Hayama M., Kobayashi S., Igawa Y., Ota H., Nishizawa O. - *Are neuroendocrine cells responsible for the development of benign prostatic hyperplasia?* Eur. Urol. (Agosto 2002); 42(2): 79-83.
17. Aumuller G., Leonhardt M., Renneberg H., Von Rahden B., Bjartell A., Abrahamsson P.A. - *Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells.* Prostate (Febbraio 2001); 46(2): 108-15.
18. Armen G. Aprikian, Carlos Cordon-Cardo, William R. Fair, Victor E. Reuter - *Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma.* Cancer (Giugno 1993); 71(12): 3952-65.
19. Giri D., Ittmann M. - *Interleukin-8 is a paracrine inducer of fibroblast growth factor 2, a stromal and epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia.* American Journal of Pathology (Luglio 2001); 159(1): 139-147.
20. Giri D., Ittmann M. - *Interleukin-1 α is a paracrine inducer of FGF7, a key epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia.* American Journal of Pathology (Luglio 2000); 157(1): 249-255.
21. Ropiquet F., Giri D., Lamb D.J., Ittmann M. - *FGF7 and FGF2 are increased in benign prostatic hyperplasia and are associated with increased proliferation.* J. Urol. (Agosto 1999); 162(2): 595-9.
22. Matsubara A. - *Studies on the mechanism of action of fibroblast growth factors in stromal cells in hyperplastic human prostate.* Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi (Maggio 1995); 86(5): 1034-43.

23. Xue Y., Van der Laak J., Smedts F., Schoots C., Verhofstad A., De la Rosette J., Schalken J. - *Neuroendocrine cells during human prostate development: does neuroendocrine cell density remain constant during fetal as well as postnatal life?* Prostate (2000); 42: 116-123.
24. Arrighi S., Cremonesi F., Bosi G., Domeneghini C. - *Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates.* Anat. Histol. Embryol. (Agosto 2004); 33(4): 225-32.
25. Arrighi S., Domeneghini C. - *Immunolocalization of regulatory peptides and 5-HT in bovine male urogenital apparatus.* Histology and Histopathology (1998); 13: 1049-1059.
26. Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige - Circolare n. 30 del 17.10.2006.
27. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria* (Novembre 2006); n. 38. [www.spvet.it].
28. Barone R. - *Anatomia comparata degli animali domestici – Ghiandole annesse all'uretra.* Vol. IV (1994); Ed. Edagricole, Bologna.
29. Bruni A.C., Zimmer U. - *Anatomia degli animali domestici – Apparato genitale maschile.* Vol. II (1992); Società Editrice Libreria, Milano.
30. Nickel R., Schummer A., Seiferle E. - *Trattato di anatomia degli animali domestici – Apparato genitale: organi genitali maschili.* Vol. II (1975); Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
31. Dellman H.D., Brown E.M. - *Istologia ed anatomia microscopica veterinaria – Apparato genitale maschile: ghiandole annesse.* Editoriale Grasso, Bologna (1981).
32. Veggetti A. - *Corso di embriologia – Apparato genitale.* Società Editrice Esculapio, Bologna (1987).
33. Biolatti B., Cabassi E., Rosmini R., Groot M.J., Castagnaro M. et al. - *Lo screening istologico nella prevenzione dell'uso di anabolizzanti nel bovino.* Large Animal Review (2003); 2: 9-15.
34. Boatto G., Culeddu N., Testa C., Neri B., Brambilla G., Barbosa J., Cruz C. - *Identification of a probable new adrenergic agonist by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.* Anal. Chim. Acta (Marzo 2007); 586 (1-2): 223-7.
35. Avendano-Reyes L., Torres-Rodriguez V., Meraz-Murillo F.J., Perez-Linares C., Figueroa-Saavedra F., Robinson P.H. - *Effects of two beta-adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot steers.* J. Anim. Sci. (Dicembre 2006); 84(12): 3259-65.

36. Le Bizec B., Van Hoof N., Courtheyn D., Gaudin I., Van De Wiele M., Bichon E., De Brabander H., André F. - *New anabolic steroid illegally used in cattle-structure elucidation of 19-norchlorotestosterone acetate metabolites in bovine urine*. J. Steroid Biochem Mol. Biol. (Gennaio 2006); 98(1): 78-89.
37. Darsiè G., Rosmini R. - *La tecnica di prelievo della ghiandola prostatica e delle ghiandole di Bartolino in vitelli presumibilmente trattati con estrogeni di sintesi*. Riv. Zoot. Vet. (1979); 5: 315-320.
38. Groot M.J. - *Histological screening for illegal administration of growth promoting agents in veal calves* (1992).
39. Luppi A. - *Istopatologia di ghiandole-organi-tessuti ormono-dipendenti nei bovini*. Atti Soc. It. Buiatria (1986); 18: 163-167.
40. Luppi A, Gianfaldoni D., Gilioli G., Del Bono G. - *Contributo alla diagnostica degli anabolizzanti. Nota II: significato diagnostico di alcuni rilievi anatomo-istologici di ghiandole ormono-dipendenti*. Il Nuovo Progresso Veterinario (1992); 47: 201-204.
41. Cannizzo F.T., Zancanaro G., Spada F., Mulasso C., Biolatti B. - *Pathology of the testicle and sex accessory glands following the administration of boldenone and boldione as growth promoters in veal calves*. J. Vet. Med. Sci. (Novembre 2007); 69(11): 1109-16.
42. Balboni G.C., Bastianini A. et al. - *Anatomia umana*. Editrice Edi-Ermes (1991): 453-458.
43. Rubin E., Farber J.L. - *Atlante di patologia sistematica e generale*. Editrice McGraw-Hill (1991): 428.
44. Rubin E., Farber J.L. - *Patologia sistematica e generale – Il tratto urinario e l'apparato genitale maschile*. Ed. McGraw-Hill (1991): 547-548.
45. Wheater, Burkitt, Daniels - *Istologia e anatomia microscopica*. Editrice Ambrosiana (1988): 286-288.
46. Rubin E., Farber J.L. - *Patologia sistematica e generale – Il tratto urinario e l'apparato genitale maschile*. Ed. McGraw-Hill (1991): 549-550.
47. Shapiro E., Hartanto V., Perlman E., Tang R., Wang B., Lepor H. - *Morphometric analysis of pediatric and nonhyperplastic glands: evidence that BPH is not a unique stromal process*. Prostate (1997); 33: 177-182.
48. Herrero M., Rodriguez A., Cejas H. - *Prostatic neuroendocrine cells*. Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Cordoba (2002); 59(1): 91-6.

49. Abrahamsson P.A. - *Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer*. Prostate Suppl. (1996); 6: 3-8.
50. Pretl K. - *Zur frage der endokrinie der menschilchen vorsteberdruse*. Virchows Arch. (1944); 312: 392-404.
51. Schalken J.A., Leenders G. - *Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology*. Urology (2003); 6 (5 Suppl. 1): 11-20.
52. Xue Y., Verhofstad A., Lange W., Smedts F., Debruyne F., De la Rosette J., Schalken J. - *Prostatic neuroendocrine cells have a unique keratin expression pattern and do not express Bcl-2 : cell kinetic features of neuroendocrine cells in the human prostate*. American Journal of Pathology (Dicembre 1997); 151(6): 1759-65.
53. Bonkhoff H., Stein U., Remberger K. - *Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers*. Hum. Pathol. (1994); 25: 42-46.
54. Abrahamsson P.A., Wadstrom L.B., Alumets J., Falkmer S., Grimelius L. - *Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands*. Pathol. Res. Pract. (Dicembre 1986); 181(6): 675-83.
55. Di Sant'Agnesse P.A., De Mesy Jensen K.L., Churukian C.J., Agarwal M.M. - *Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells. Distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains*. Arch. Pathol. Lab. Med. (Luglio 1985); 109(7): 607-12.
56. Bonkhoff H., Wernert N., Dhom G., Remberger K. - *Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic and neoplastic human prostate*. Prostate (1991); 19: 91-98.
57. Bonkhoff H., Stein U., Remberger K. - *Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells*. Human Pathol. (1995); 26: 167-170.
58. Vittoria A., Cocca T., La Mura E., Cecio A. - *Immunocytochemistry of paraneurons in the female urethra of the horse, cattle, sheep and pig*. Anatomy Records (1992); 233: 18-24.
59. Cecio A., Vittoria A. - *Urogenital paraneurons in several mammals*. Arch. Histol. Cytol. (1989); 52 Suppl.: 403-13.
60. Cetyn Y. - *Chromogranin A immunoreactivity and Grimelius' argiophilia. A correlative study in mammalian endocrine cells*. Anat. Embryol. (1992); 185(3): 207-15.

61. Planz B., Aretz H.T., Wang Q., Tabatabaei S., Kirley S.D., Lin C.W., McDougal W.S. - *Immunolocalization of the keratinocyte growth factor in benign and neoplastic human prostate and its relation to androgen receptor*. Prostate (Dicembre 1999); 41(4): 233-42.
62. Polnaszek N., Kwabi-Addo B., Wang J., Ittman M. - *FGF-17 is an autocrine prostatic epithelial growth factor and is upregulated in benign prostatic hyperplasia*. Prostate (Giugno 2004); 60(1): 18-24.
63. Nakano K., Fukabori Y., Itoh N., Lu W., Kan M., McKeehan W.L., Yamanaka H. - *Androgen-stimulated human prostate epithelial growth mediated by stromal-derived fibroblast growth factor-10*. Endocr. J. (Giugno 1999); 46(3): 405-13.
64. Smith P., Rhodes N.P., Ke Y., Foster C.S. - *Upregulation of estrogen and androgen receptors modulate expression of FGF-2 and FGF-7 in human, cultured, prostatic stromal cells exposed to high concentrations of oestradiol*. Prostate Cancer Prostatic Dis. (2002); 5(2): 105-10.
65. Steiner M.S. - *Role of peptide growth factors in the prostate – a review*. Urology (1993); 42: 99-100.
66. Deshmukh N. et al. - *Differential expression of acidic- and basic- fibroblast growth factors in benign prostatic hyperplasia identified by immunohistochemistry*. Br. J. Urol. (1997); 80: 869-874.
67. Saez C. et al. - *Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors FGF-R1 and FGF-R2 in human benign prostatic hyperplasia treated with finasteride*. Prostate (1990); 40: 83-88.
68. Sherwood E.R. et al. - *Basic fibroblast growth factor. A potential mediator of stromal growth in the human prostate*. Endocrinology (1992); 130: 2955-2963.
69. Boget S., Cereser C., Parvaz P., Leriche A., Revol A. - *Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) is over-expressed in benign prostatic hyperplasia whereas FGFR2-IIIc and FGFR3 are not (Clinical study)*. European Journal of Endocrinology (2001); 145: 303-310.
70. Story M.T., Hopp K.A., Molter M., Meier D.A. - *Characteristics of FGF-receptors expressed by stromal and epithelial cells cultured from normal and hyperplastic prostates*. Growth Factors (1994); 10(4): 269-80.