

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Veterinarie**

**Ciclo XXVI**

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H1**

**Settore Scientifico disciplinare: VET/01**

**CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E  
NEUROCHIMICA DEI NEURONI SENSITIVI E  
MOTORI DEL TRIGONO VESCICALE E DEL  
MUSCOLO URETRALE DI MAIALE**

**Presentata da: Dott.ssa Caterina Sorteni**

**Coordinatore Dottorato**

**Chiar.mo Prof. Carlo Tamanini**

**Relatore**

**Chiar.mo Prof. Roberto Chiocchetti**

**Esame finale anno 2014**

## **Introduzione**

### **Capitolo 1**

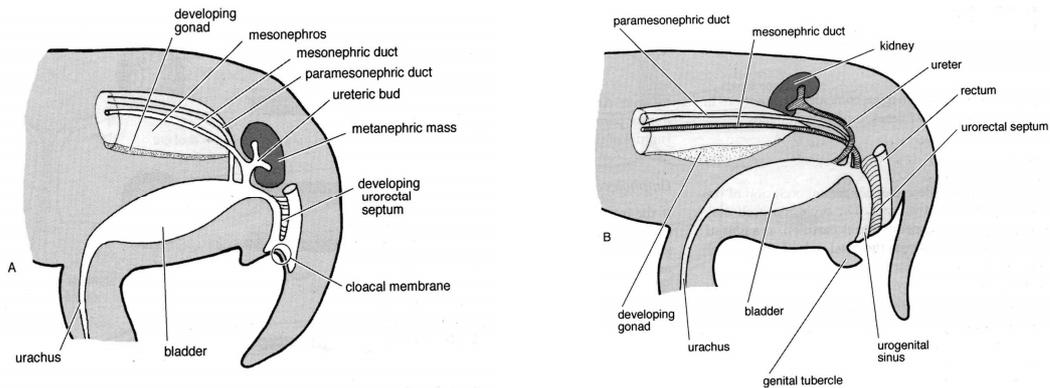
#### **Anatomia della vescica urinaria**

In questo capitolo saranno studiati i differenti aspetti della vescica urinaria, dallo sviluppo embriologico all'ultrastruttura. La vescica urinaria è un serbatoio impari, muscolo-membranoso, molto dilatabile, in cui l'urina si accumula di continuo per essere espulsa ad intermittenza (minzione) nelle varie fasi della giornata. Essa è consistente al tatto e poco voluminosa, risulta allungata caudalmente. Quando è vuota e contratta presenta una superficie raggrinzita; la sua forma ovviamente cambia a seconda del grado di replezione o di rilasciamento.

#### **Cenni di embriologia**

Durante lo sviluppo dell'intestino caudale, il setto uro-rettale divide la cloaca in retto, posto dorsalmente, e seno urogenitale, posto ventralmente; tutte strutture di origine endodermica. Al punto di ingresso del dotto mesonefridico, o di Wolff, il seno urogenitale primitivo si divide in una parte rostrale, il canale vescico-uretrale, primordio della vescica, e una caudale, il seno uro-genitale propriamente detto, da cui originerà l'uretra peniena nel maschio o l'uretra e il vestibolo nella femmina. Alla parete dorsale della vescica in via di sviluppo si associano anche le estremità dei futuri ureteri e dei dotti mesonefridici, futuri dotti del sistema genitale. Poiché queste strutture, di origine mesodermica, sono incorporate nel trigono, area triangolare localizzata sul dorso della parete vescicale, l'epitelio di rivestimento del trigono avrà origine mesodermica, mentre l'epitelio della restante parte della vescica avrà origine endodermica (McGeady et al. 2006) (Fig. 1a). La vescica, che deriva dalla porzione intraembrionale dell'allantoide, si estende nell'embrione sino in prossimità dell'ombelico, dove l'uraco la unisce al condotto allantoideo, che decorre nel cordone ombelicale mettendo in comunicazione la cavità dell'organo con quella dell'allantoide (Barone, 2003).

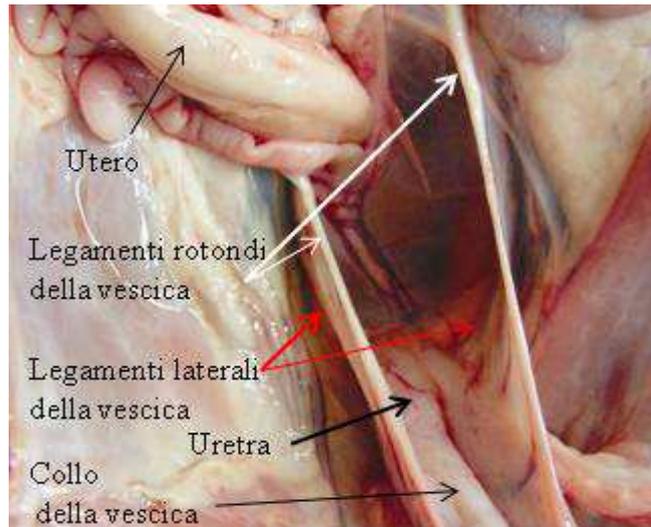
Da ciascun lato la vescica, assieme all'uraco, si presenta accompagnata dalle arterie ombelicali (Barone 2003). Nei soggetti nei quali l'arteria ombelicale si oblitera, costituisce il legamento rotondo della vescica.



**Fig. 1a.** Sezione sagittale di un embrione di mammifero in cui è possibile osservare la fase in cui il setto uro-rettale divide la cloaca nel retto (dorsalmente) e nel seno urogenitale (ventralmente). Modificato da McGeady et al. (2006).

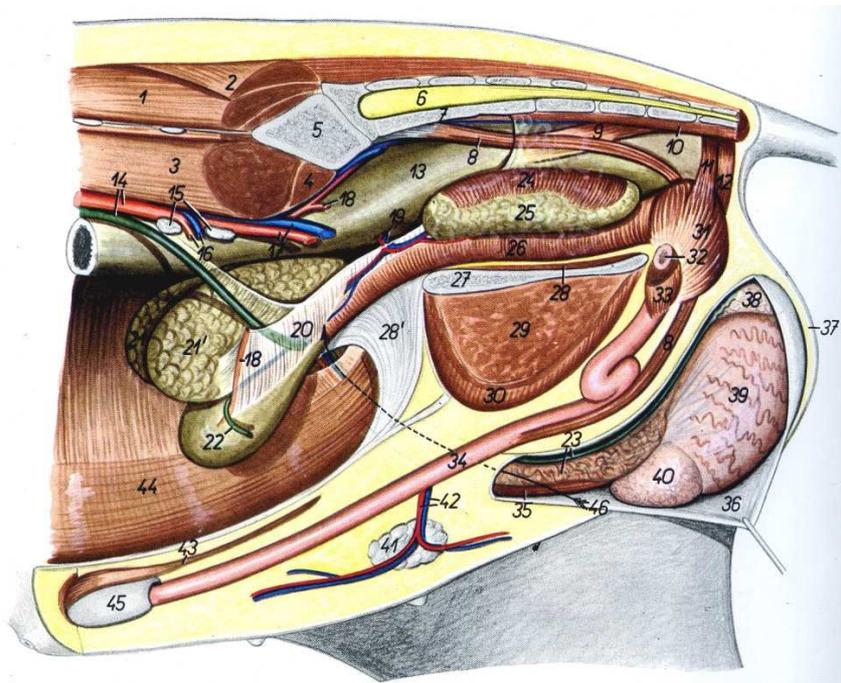
La vescica subisce un trascinarsi post-natale in direzione dell'entrata della cavità pelvica. Durante questa fase, anche il suo polo craniale si oblitera contemporaneamente alle arterie ombelicali.

La vescica di maiale, in condizione di replezione media, è ovoidale, di ampie dimensioni ed è collocata quasi totalmente in addome, anche quando è vuota (Fig. 1c). Il peritoneo riveste quasi completamente la vescica, formando un fondo cieco ventrale, denominato fondo cieco pubo-vescicale (*excavatio pubovesicalis*), e uno dorsale, chiamato fondo cieco vescico-genitale (*excavatio vescicogenitalis*). Esso è detto vescico-uterino nella femmina e vescico-deferenziale nel maschio (Fig. 1b).



**Fig. 1b.** Fondo cieco vescico-genitale di scrofetta (immagine ottenuta in sede operatoria).

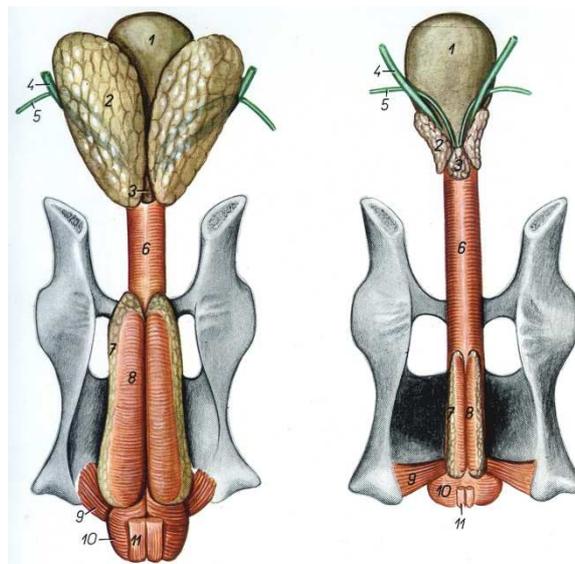
Gli osti ureterici, preceduti da colonne ureteriche rilevate che marciano il decorso terminale sottomucoso degli ureteri, sono molto ravvicinati al collo della vescica (Barone, 2003).



**Fig. 1c** - Immagine della vescica di verro che mostra i rapporti con gli organi contigui. Da notare come la vescica sia collocata interamente in cavità addominale (Modificato da Popesko 2004).

## Anatomia macroscopica della vescica

Come già osservato, la vescica urinaria è un serbatoio impari, di forma ovoidale, muscolo-membranoso e molto dilatabile, in cui si accumula l'urina, che la sua contrazione espelle al momento della minzione. È quasi impossibile valutarne la reale dimensione, infatti la sua capacità, misurata nel cadavere attraverso replezioni sperimentali, presenta valori differenti rispetto a quelli misurati in vita. La capacità fisiologica è determinata dall'insorgere dello stimolo della minzione, che comunque è inferiore alla capacità massima che si raggiunge nei Mammiferi educati (cane, gatto) che vivono in appartamento. Nel maiale, anche quando è vuota, la vescica si colloca quasi totalmente in addome. In linea di massima si può affermare che la capacità massima raggiunge 2-3 litri nel maiale. Il tono della muscolatura decresce fortemente durante la distensione lenta e progressiva (Barone 2003).



**Fig. 1d.** Veduta dorsale della vescica urinaria e delle ghiandole annesse all'apparato genitale maschile di maiale. A sinistra animale intero; a destra animale castrato. Visibili i rapporti della vescica con gli ureteri, i dotti deferenti, le ghiandole vescicolari e la prostata (Modificato da Popesko 2004).

Nella vescica riconosciamo tre parti: una parte craniale, l'apice (*Apex vesicae*), che nella sua porzione centrale spesso mostra la cicatrice dovuta all'obliterazione dell'uraco; una parte intermedia, o corpo (*Corpus vesicae*), che presenta nella sua faccia

dorsale e a breve distanza dal collo la penetrazione dei due ureteri (Fig. 1d); infine una parte più caudale, definita collo (*Cervix vesicae*), che si continua con l'uretra.

La cavità della vescica è rivestita da una mucosa pallida, bianco-rosata o grigiastrea e fornita di pieghe irregolari, più o meno pronunciate a seconda del grado di replezione, che scompaiono gradualmente con la distensione. Al limite con il fondo, la faccia dorsale mostra i due osti ureterici, ognuno dei quali è preceduto da un rilievo della mucosa o colonna ureterica, che segna il decorso nella sottomucosa della terminazione dell'uretere. Un terzo orifizio, più largo e mediano, corrisponde al collo della vescica. Esso è l'ostio interno della uretra e immette in tale condotto. Esso occupa il vertice di un triangolo, la cui base è delimitata dagli orifizi ureterici e a livello del quale la parete presenta una peculiarità: il trigono vescicale, un tempo denominato "triangolo di Lieutaud".

Il trigono è bordato, da entrambi i lati, dalla piega ureterica che, sul piano mediano, si riunisce alla cresta uretrale. Il trigono e la parte adiacente dell'uretra derivano dal segmento terminale dei condotti mesonefrici embrionali. Durante lo sviluppo questo segmento è assorbito dalla parete della vescica in modo da riportare in quest'ultima l'apertura degli ureteri, originariamente collegati ai condotti mesonefrici.

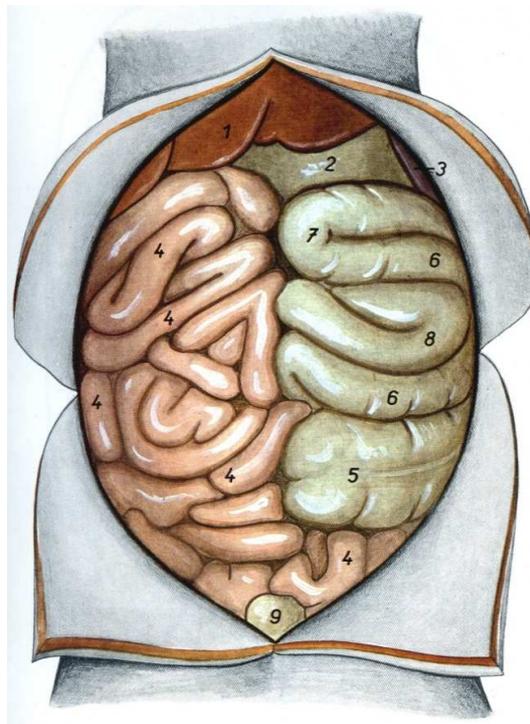
Anche la struttura del trigono è diversa da quella delle regioni vicine: il connettivo è scarso e la mucosa, più sottile e più aderente, è liscia e priva di pieghe. La parete della vescica presenta spessori differenti a seconda dello stato di riempimento, essa è molto più sottile nello stato di replezione che in quello di vacuità; il suo spessore può infatti passare da 2-3 millimetri a 1 centimetro o anche più.

La vescica urinaria risulta costituita da tre tonache: la sierosa, la muscolare e la mucosa.

### **Rapporti topografici**

Ciò che, nel maiale, consente alla vescica di instaurare un rapporto diretto ed esteso con l'intestino (Fig. 1e) è il grande omento. Il maschio e la femmina presentano differenze nei rapporti della vescica con gli altri organi addominali. Nel verro, solo il collo della vescica prende rapporto tanto con gli ureteri, quanto con i dotti deferenti e con le ghiandole vescicolari. Nella scrofa, invece, l'apice della vescica è in rapporto con le corna uterine, il corpo della vescica è in rapporto con il corpo dell'utero, mentre il collo

della vescica è in rapporto sia con il collo dell'utero che con il tratto craniale della vagina (Bortolami-Callegari-Beghelli, 2004).

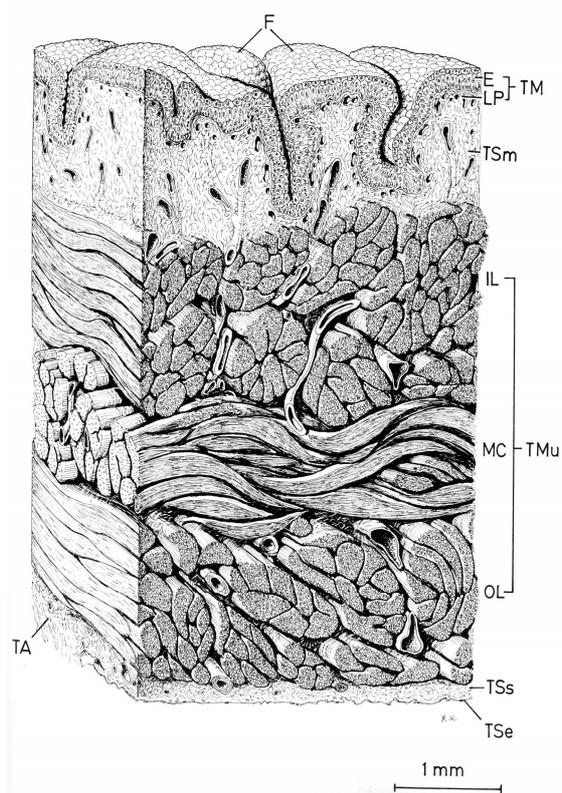


**Fig. 1e.** L'immagine mostra una veduta ventrale degli organi addominali, vescica compresa (indicata con il numero 9). Sono evidenti i rapporti con le anse digiunali (indicate con il numero 4) (modificato da Popesko 2004).

In entrambi, poi, il corpo e l'apice della vescica sono in rapporto con parti dell'intestino tenue e crasso. La faccia dorsale del corpo è in rapporto con il colon discendente, mentre l'apice è in rapporto con le anse digiunali.

### **Anatomia microscopica della vescica**

La vescica si compone di tre tonache, dall'interno verso l'esterno: l'urotelio, o tonaca mucosa, la tonaca muscolare e la tonaca sierosa (Fig. 1f).



**Fig. 1f.** Disegno in cui sono rappresentati gli strati della parete della vescica di uomo. Modificato da Krstic (2004).

### **Tonaca mucosa**

Esso è costituito da un epitelio di transizione (pluriseriato) e da una lamina propria; la *muscularis mucosae* può essere del tutto assente, come ad esempio nel gatto, oppure essere poco sviluppata, come nel maiale.

L'urotelio riveste la maggior parte delle vie urinarie a partire dalla pelvi renale, è formato da 3-4 strati di cellule e la sua altezza varia da specie a specie. Vi si riconoscono infatti uno strato di cellule basali, uno o più strati di cellule intermedie ed uno strato di cellule superficiali differenziate (Walker, 1960; Firth e Hicks, 1973).

Le cellule basali, tra le quali troviamo i precursori delle cellule che costituiscono gli altri strati dell'urotelio, sono di forma cuboidale o colonnare, sono piccole (10  $\mu\text{m}$  di diametro; Apodaca, 2004) e presentano un voluminoso nucleo (1/3 del volume cellulare) con profonde invaginazioni. Emidesmosomi ancorano queste cellule ad una sottile lamina basale (Hicks, 1965). La loro vita media è stimata in 3-6 mesi. Questo intervallo è così ampio a causa di un indice replicativo alquanto ridotto. Questo indice, detto anche mitotico, esprime il rapporto tra il numero di cellule in proliferazione e il numero di

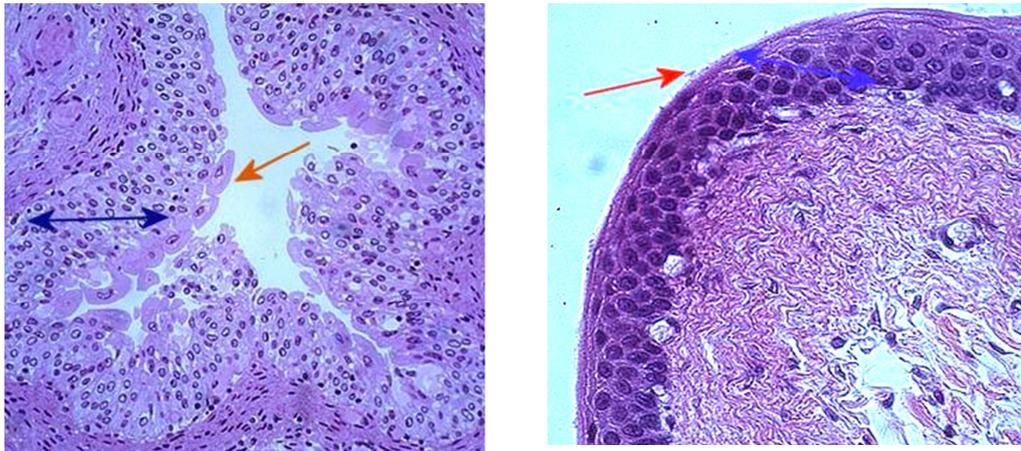
cellule totali, (Apodaca, 2004). Nel topo si aggira intorno all'1% (Levi et al. 1969) e nel ratto è ancora minore, essendo inferiore allo 0,5 % (Messier e Leblonde 1960).

Secondo Martin (1972) la sostituzione e la differenziazione cellulare dell'urotelio si svolgono secondo una precisa modalità. Inizialmente le cellule dello strato basale si allungano fino a formare piccole cellule piriformi. In seguito, due o più di queste cellule si fondono costituendo una grossa cellula piriforme superiore; a questo punto i nuclei possono rimanere separati o fondersi, dando luogo, in questo secondo caso, a un grosso nucleo poliploide.

Le cellule piriformi costituiscono lo strato intermedio. Esse presentano un diametro di 10–25  $\mu\text{m}$  e sono disposte in lamine sovrapposte il cui numero varia da specie a specie; le cellule di uno strato, tutte connesse con la lamina basale, si interdigitano più o meno profondamente con quelle dello strato sovrastante o sottostante.

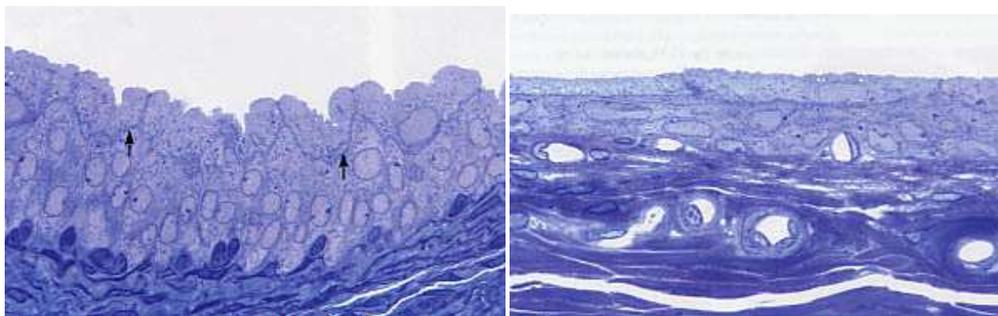
Le *umbrella cells*, grandi cellule esagonali, costituiscono lo strato più superficiale dell'urotelio. Esse hanno vita lunga ma possono essere rapidamente rigenerate quando l'urotelio viene danneggiato; questa rigenerazione è il risultato di una divisione cellulare all'interno di uno dei tre strati cellulari sottostanti a cui segue una fusione di più cellule con conseguente creazione di *umbrella cells* multinucleate.

La plasticità dell'urotelio, dovuta alla disposizione pseudostratificata delle sue cellule, ha la funzione di consentire l'espansione volumetrica della vescica. Quando la vescica si riempie, infatti, l'epitelio si distende e le cellule più superficiali e quelle degli strati intermedi si appiattiscono. In questo modo esse spingono il loro nucleo e il citoplasma apicale verso il peduncolo che le ancora alla lamina basale, in modo da interpersi ai nuclei delle cellule più profonde (Fig. 1m, 1n).



**Fig. 1m,n.** Le micrografie delle sezioni istologiche (microscopia ottica) di mucosa vescicale (freccia azzurra) dimostrano come lo stato di replezione modifichi la forma delle sue cellule: a sinistra la vescica è vuota e le cellule dello strato superficiale della mucosa (freccia arancione) sono così “rilassate” da sporgere nel lume vescicale. L’immagine a destra ritrae la mucosa di una vescica in cui lo stato di replezione provoca un evidente appiattimento delle sue cellule.

Tale disposizione pseudostratificata permette alle cellule di deformarsi in risposta a notevoli distensioni senza tuttavia perdere i loro reciproci rapporti. Se l’epitelio fosse stratificato, per spiegare la diminuzione di spessore concomitante alla sua distensione, bisognerebbe pensare a una dislocazione delle cellule intermedie, con conseguente perdita dei rapporti cellulari, difficile da ammettere in un tessuto epiteliale le cui funzionalità dipendono, per l’appunto, da tali rapporti.



**Fig. 1n** – Le micrografie delle sezioni semifini (microscopia ottica) di mucosa vescicale dimostrano come lo stato di replezione modifichi la forma delle sue cellule: in alto la vescica è vuota e la mucosa si presenta più ispessita; le frecce nere indicano le *umbrella cells*. L’immagine in basso ritrae la mucosa di una vescica in cui lo stato di replezione provoca un evidente appiattimento delle sue cellule.

Le *umbrella cells* sono unite da *tight junctions* (Fig. 1o) e sono rivestite da particolari molecole, definite uroplachine (Fig. 1p, 1q), la cui funzione sarebbe quella di impedire il passaggio di protoni, sostanze azotate (allantoina, acido urico ecc) e acqua. Studi ultrastrutturali hanno infatti dimostrato che l'urotelio dei Mammiferi elabora, negli stadi più avanzati del differenziamento cellulare, una membrana plasmatica altamente specializzata in grado di produrre delle placche sulla superficie luminale, le uroplachine (Wu et al. 1994). Si ritiene che queste placche dall'apparenza rigida proteggano, irrobustendola, la superficie apicale dell'urotelio

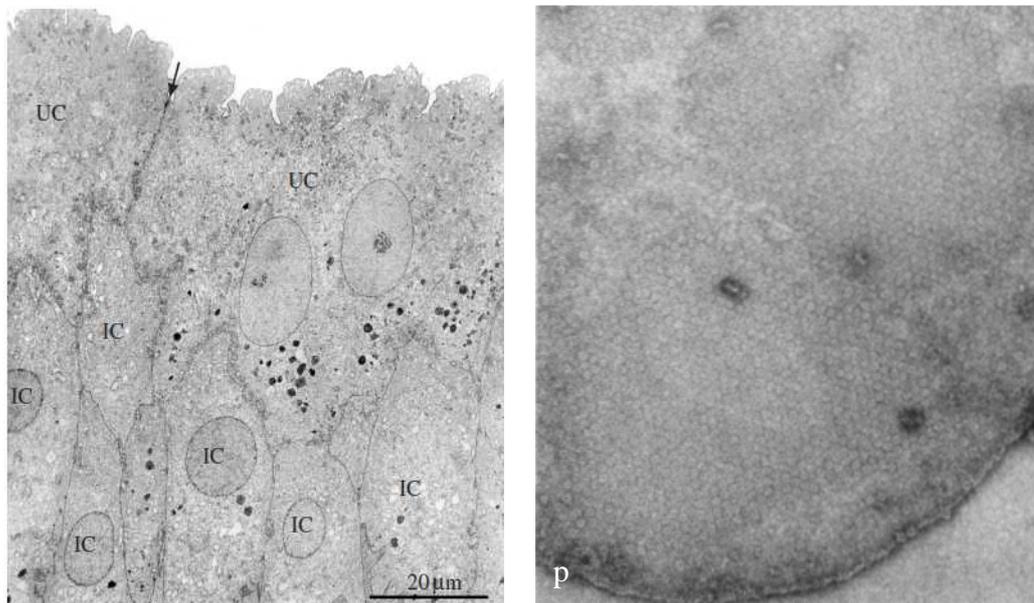


Figura 1o-p – **o**: La micrografia (microscopia elettronica) ritrae alcuni elementi della mucosa di vescica. Le cellule ad “ombrello” o *umbrella cells* sono indicate con le lettere UC; le cellule degli strati intermedi sono indicate con le lettere IC. La freccia indica una *tight junction* interposta tra due cellule ad ombrello. Modificato da Apodaca (2004); **p**: Microfotografia (microscopia elettronica) delle placche di uroplachina nel cane. Modificata da Wu et al. (1994).

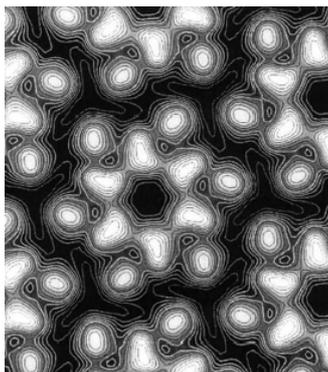
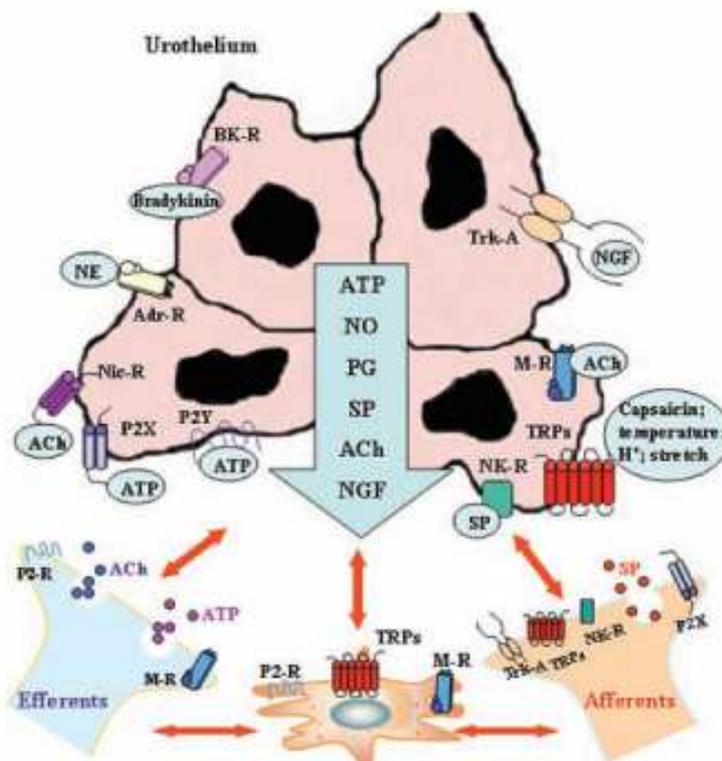


Fig. 1q – Micrografia elettronica indicante la struttura proteica esagonale delle molecole di uroplachina dell'urotelio di cane Modificato da Wu et al. (1994).

dai danneggiamenti cellulari dovuti alla sovradistensione della vescica. Queste placche hanno aspetto asimmetrico e presentano uno strato luminale di 8 nm e uno strato citoplasmatico di 4 nm (Porter e Bonneville, 1963; Hicks, 1965; Koss, 1969). Lo studio delle placche appartenenti a varie specie animali ha dimostrato che queste sono composte da densi aggregati di particelle proteiche esagonali (12 nm di diametro) che formano aggregati cristallini (Wu et al., 1994). Al di sopra di queste placche è presente uno strato di mucina che sembra avere un ruolo importante nell'ostacolare l'adesività batterica e lo sviluppo di colonie di patogeni (Parson et al., 1980). Wu et al., (1990) hanno dimostrato l'esistenza di almeno 4 tipi di uroplachine che differiscono per peso molecolare.

La **lamina propria** della mucosa vescicale è formata da tessuto connettivo lasso contenente numerose fibre elastiche, soprattutto verso il collo della vescica, dove hanno disposizione circolare. Sotto la lamina propria vi sono numerosi capillari; numerose sono anche le fibre nervose.

La *muscularis mucosae* varia di spessore da specie a specie: nel maiale, nei Ruminanti e nel cane è estremamente sottile e manca completamente nel gatto, mentre presenta uno spessore più pronunciato nel cavallo. In tutti gli animali la *muscularis mucosae* tende a diminuire a livello del collo.



**Fig. 1r** – Lo schema indica un modello ipotetico rappresentante le possibili interazioni delle fibre nervose afferenti ed efferenti con le cellule uroteliali, la muscolatura liscia e i miofibroblasti. La stimolazione di recettori e canali a livello dell'urotelio può determinare il rilascio di mediatori che hanno come *target* le fibre nervose e altre cellule, ad esempio i mastociti. Le cellule uroteliali possono essere attivate grazie alla secrezione per via autocrina (autoregolazione) o paracrina (sostanze rilasciate da differenti cellule contigue). Abbreviazioni: Ach, acetilcolina; AdR, recettori adrenergici; BR, recettori per la bradichinina; MR, recettori muscarinici; NE, nor-adrenalina; NGF, fattore di crescita neuronale; NR, recettori per la neurochinina; NicR, recettori nicotinici; NO, ossido nitrico; P2R, recettore 2 purinergico non definito (per l'ATP); recettori P2X e P2Y, recettori purinergici; PG, prostaglandine; SP, sostanza P; Trk-A, recettore tirosina chinasi A, recettore ad alta affinità per il NGF (nerve growth factor). (Modificato da Birder et al., 2010).

## Tonaca muscolare

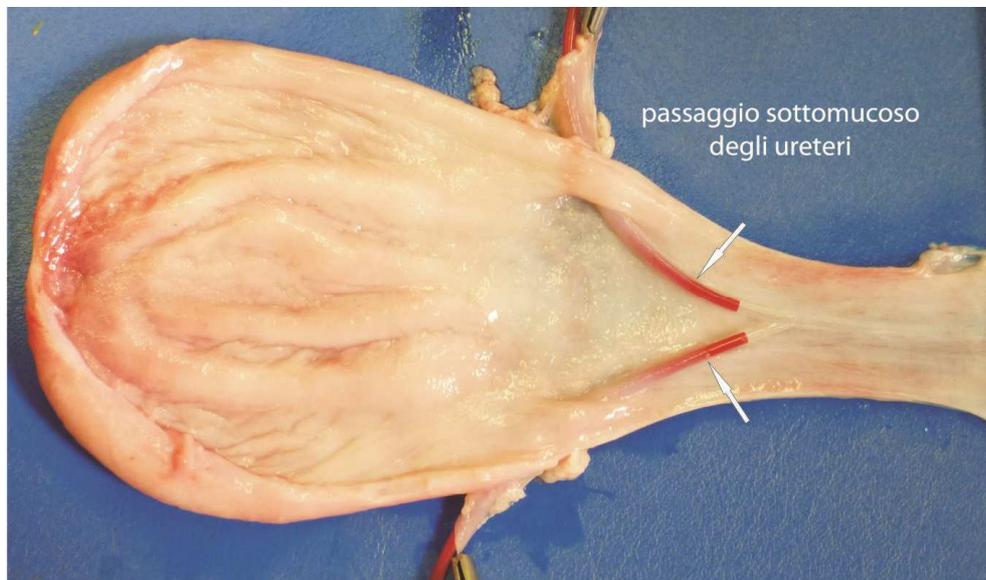
La tonaca muscolare presenta tre strati mal definiti a disposizione intrecciata, in cui lo strato interno e quello esterno sono disposti longitudinalmente, mentre lo strato medio è circolare. Spesso è visibile in superficie l'intreccio tra i fasci longitudinali esterni e i fasci circolari intermedi. La muscolatura della vescica è chiamata muscolo detrusore e, interdigitandosi con lo strato muscolare longitudinale dell'uretere a livello della giunzione uretro-vescicale, forma uno sfintere che impedisce il reflusso dell'urina.

### **Tonaca sierosa**

Come nell'uretere, l'estensione del rivestimento peritoneale è variabile a seconda della specie: nel maiale e nei Carnivori, dove l'organo è totalmente accolto in cavità addominale, la vescica è interamente rivestita dal peritoneo (Barone, 2003).

### **Uretere**

Gli ureteri, abbandonato l'ilo renale, si portano caudo-ventralmente nello spazio retro peritoneale per raggiungere il collo vescicale e presentano un decorso intravescicale sottomucoso di circa 1-3 cm (Dalmose et al. 2000) (Fig. 1s).



**Fig.1s.** Aspetto della parete interna dorsale della vescica di maiale in seguito ad incisione ventrale. Il colorante rosso presente all'interno dei due tubini di silicone inseriti nel lume degli ureteri permette di apprezzare il loro tragitto vescicale intramurale (sottomucoso). Le frecce indicano gli osti ureterici.

La parete di ciascun uretere è composta da tre tonache: mucosa, muscolare e avventizia.

### **Tonaca mucosa**

La tonaca mucosa si presenta rivestita da un epitelio di transizione, appoggiato su di uno strato di connettivo lasso e costituito da 5-6 strati di cellule, che varia nello spessore a seconda della specie. La tonaca è sollevata in pieghe longitudinali che danno al lume, in sezione trasversale, un aspetto stellato. Essa è pallida, giallo rosata, è relativamente sottile e si stacca facilmente dalla muscolare, tranne in corrispondenza del trigono

vescicale, dove è molto aderente. La sua tonaca propria, dotata di numerose fibre elastiche, diventa lassa vicino alla muscolare, dove fa le veci di una sottomucosa, consentendo così alla mucosa di formare numerose pieghe quando l'organo è vuoto. La tonaca propria è totalmente sprovvista di ghiandole, tranne che nel trigono nei pressi del collo, dove sono stati descritti rudimenti ghiandolari paragonabili a elementi prostatici erranti. L'epitelio è del tipo di transizione, con notevole elasticità visto che le cellule mutano forma a seconda che la vescica sia vuota o a pareti distese. L'assisa di cellule basali, cubiche o prismatiche, riposa su una membrana basale estremamente sottile. Superiormente, vi sono 4-8 file di cellule poliedriche, chiare, con grosso nucleo centrale e di forma variabile; durante la distensione, esse si presentano molto più appiattite e sembra che si riduca il numero del loro assise. Infine, la superficie è occupata da una fila di cellule appiattite e provviste di una cuticola che impedisce la filtrazione dell'urina attraverso la parete vescicale, rendendola del tutto priva di capacità di assorbimento nel vivente.

I nervi traggono origine dal plesso pelvico (simpatico) e dalle branche ventrali dei nervi sacrali (parasimpatici); sulla superficie dell'organo, formano una rete lassa dalla quale derivano dei rami che si distribuiscono alla tonaca muscolare, costituendo un plesso cosparso di piccoli ammassi di cellule gangliari. Sono presenti, inoltre, delle fibre vasomotorie, che decorrono attorno ai vasi, e delle fibre sensitive, che si arborizzano fin dentro l'epitelio. I nervi parasimpatici aumentano il tono della muscolatura, mentre quelli simpatici lo abbassano.

### **Tonaca muscolare**

La tonaca muscolare presenta tre strati mal definiti: quello interno e quello esterno sono longitudinali, quello medio è circolare. Spesso, specialmente lo strato esterno, presenta i propri fasci separati da connettivo lasso. Si viene quindi a creare una spiralizzazione della muscolatura che rafforza l'azione peristaltica che fa progredire l'urina distalmente verso la vescica urinaria. Nell'uretere del gatto è assente lo strato longitudinale interno, ad eccezione della porzione prossimale, comunque poco sviluppata. I due strati circolari scompaiono nel punto in cui gli ureteri penetrano nella parete della vescica e i due strati longitudinali si mescolano con quelli della vescica.

### **Tonaca sierosa od avventizia**

A seconda dell'estensione dei rivestimenti peritoneali, del tratto urinario considerato e della quantità di tessuto adiposo periuretrale, il rivestimento più esterno dell'uretere può essere un'avventizia o una sierosa. L'avventizia è costituita da tessuto connettivo lasso contenente fibre collagene ed elastiche. La sierosa ricopre la totalità dell'organo nel maiale e questo rivestimento peritoneale è molto aderente, inseparabile dalla tonaca muscolare a livello dell'apice e del corpo.

### **Uretra**

L'uretra è il condotto muscolo-membranoso mediante il quale l'urina viene espulsa verso l'esterno. Essa origina dal collo della vescica mediante l'ostio interno dell'uretra (*Ostium urethrae externum*), un tempo denominato meato urinario. Nella femmina, l'uretra è rettilinea, si presenta breve ed esclusivamente urinaria; il suo ostio esterno sbocca sul pavimento del vestibolo della vagina (Barone, 2003).

Nel maschio l'uretra presenta una notevole lunghezza e termina con un ostio esterno spostato all'estremità libera del pene. L'uretra ha una parete formata da quattro tonache: mucosa, sottomucosa, muscolare e avventizia. La mucosa dell'uretra si solleva in pieghe conferendo al lume la forma di semiluna. La struttura dell'uretra va considerata in maniera distinta per i maschi e per le femmine, per il decorso molto più breve in queste ultime, e per la struttura stessa dell'organo che si presenta differente. In tutti i Mammiferi domestici, l'epitelio di rivestimento è un epitelio di transizione in prossimità del collo della vescica che, avvicinandosi all'orifizio esterno, si trasforma gradualmente in un epitelio pavimentoso stratificato.

La scrofa è l'unico animale che presenta un epitelio di transizione per tutta la lunghezza dell'uretra. Per quello che riguarda l'uretra maschile, in tutti i Mammiferi la parte pelvica dell'uretra è rivestita da urotelio. Nella maggior parte delle specie domestiche, vicino al collo della vescica, sono presenti cellule mucipare, mentre nella scrofa e nella cavalla si trovano anche delle cellule caliciformi.

La sottomucosa è più compatta nella zona sottostante l'epitelio, dove è frequente la presenza di noduli linfatici in tutti gli animali domestici; nella scrofa sono inoltre presenti dei corpi cavernosi. Nella parte profonda della mucosa si trovano isolati fasci di

fibre muscolari lisce longitudinali, mentre non si può parlare di una vera e propria *muscularis mucosae*.

### **Tonaca muscolare**

L'uretra del verro è dotata di un doppio strato muscolare, di cui quello interno, prolungamento dello sfintere vescicale, è costituito da fasci di cellule muscolari lisce. Lo strato esterno è formato da fibre striate disposte in posizione laterale e ventro-laterale che costituiscono il tratto iniziale del muscolo uretrale (Barone, 2003).

## Capitolo 2

### Urotelio = *sensory web* (rete sensitiva)

L'urotelio è in grado di esprimere specifiche molecole in risposta a stimoli meccanici, termici e chimici; inoltre, grazie alla presenza di *tight junctions*, costituisce una barriera meccanica in grado di impedire il passaggio di ioni e soluti dal lume vescicale ai tessuti sottostanti.

Nella vescica urinaria dei Mammiferi, compreso l'uomo, sono stati identificati dei nervi sensitivi non solo nel muscolo detrusore ma anche a ridosso dell'urotelio (Gosling e Dixon 1974; Wakabayashi et al. 1993; Maggi, 1995; Gabella e Davis, 1998). Questo plesso nervoso sub-uroteliale è relativamente scarso nel corpo della vescica, ma diventa progressivamente più denso in prossimità del collo ed è particolarmente importante nel trigono.

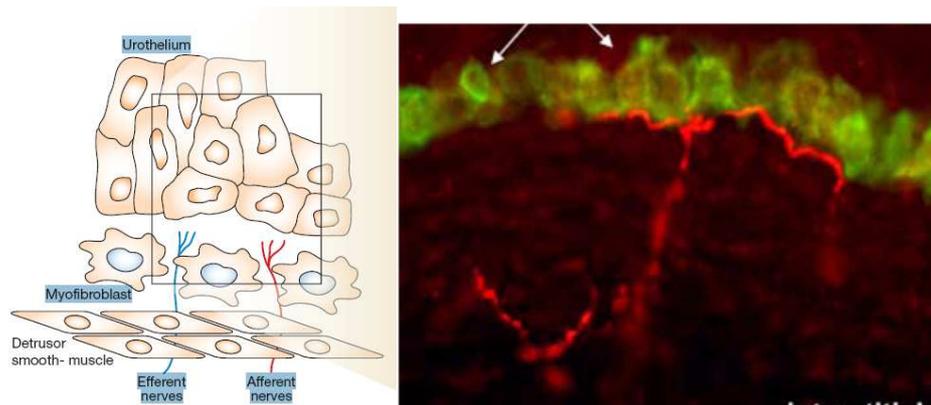
Wakabayashi e Colleghi (1993) hanno identificato, nella vescica di uomo, fibre nervose immunoreattive alla sostanza P (SP-IR) nella sottomucosa e nella lamina propria anche a ridosso dell'urotelio. Gabella and Davis (1998) hanno identificato, nel ratto, fibre nervose immunoreattive al peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP-IR) distribuite alla base dell'epitelio (plesso sub-uroteliale), nell'epitelio, lungo i vasi sanguigni arteriosi e venosi e nello spessore del muscolo detrusore. Nella mucosa tutte le fibre afferenti, ad eccezione delle fibre perivascolari, sono distribuite all'interno dell'epitelio o del plesso sub-uroteliale. La distribuzione del plesso sub-uroteliale è più consistente nel collo della vescica e nel tratto iniziale dell'uretra, mentre diviene progressivamente meno densa nelle regioni adiacenti; tuttavia, la mucosa del corpo della vescica non presenta fibre afferenti.

L'innervazione afferente della muscolatura, invece, sembra essere diffusa e uniforme in tutto l'organo; è infatti presente un'innervazione bilaterale di molte regioni della mucosa e della muscolatura, compresi alcuni fasci di cellule muscolari.

La densità delle fibre sensitive (colinergiche post-sinaptiche) sub-uroteliali di donne sofferenti di instabilità idiopatica del muscolo detrusore (*idiopathic detrusor instability*) è stata comparata con quella di donne sane (Moore et al, 1992). I risultati suggeriscono che una relativa abbondanza di fibre sensitive sub-uroteliali consentirebbe un miglior apprezzamento dello stato di riempimento vescicale e sarebbe all'origine della

frequenza e dell'urgenza della minzione, caratteristiche in pazienti con instabilità del detrusore. Se questo aumento delle fibre sub-uroteliali, o le perturbazioni della loro funzione, sia effettivamente responsabile dell'iperattività del muscolo detrusore rimane, però, ancora da stabilire (Apodaca et al. 2007).

Le cellule basali dell'urotelio, come già ricordato sopra, sono piccole, formano un singolo strato e sono in contatto con il tessuto connettivo sottostante in cui sono presenti i vasi sanguigni. Queste cellule sono gli elementi precursori degli altri tipi cellulari (Martin, 1972; Hicks, 1975). Le cellule intermedie, piriformi, sembrano appoggiate sulle cellule sottostanti e non direttamente sulla membrana basale; in realtà, se si osserva una sezione trasversale di tessuto, si riconosce una organizzazione stratificata delle cellule che, quando la vescica è vuota, si presentano disposte in più file il cui numero, all'aumentare del volume vescicale, si riduce proporzionalmente allo stato di riempimento. Le cellule intermedie, infatti, sono lunghe e sottili con processi citoplasmatici che le collegano alla membrana basale (Petry e Amon, 1966; Martin, 1972). Lo strato più superficiale è rappresentato dalle *umbrella cells*, che sono di forma poliedrica e molto grandi. In alcune specie, come il ratto e la cavia, sono comuni le *umbrella cells* multinucleate che, come le cellule intermedie, possono anche avere delle proiezioni sottili che le collegano alla membrana basale (Hicks, 1975; Apodaca, 2004). Inoltre, la membrana apicale delle *umbrella cells* ha sulla sua superficie un corredo unico in proteine e lipidi che contribuisce alla bassa permeabilità di questo dominio di membrana per l'acqua e per i soluti (Lewis, 2000; Negrete, et al. 1996; Hu, et al 2002; Apodaca, 2004). Studi recenti indicano che l'uroepitelio può alterare la composizione ionica e la tipologia di proteine presenti nelle urine (Lewis, 2000; Deng, et al. 2001; Wang, et al. 2003;). Questi approfondimenti stanno fornendo nuovi indizi su come siano assemblati alcuni domini di membrana specializzati, su come le cellule epiteliali percepiscano e rispondano a stimoli meccanici, quali ad esempio la pressione, e su come le cellule epiteliali possano comunicare stimoli meccanici al sistema nervoso. L'urotelio sembra essere il *target* di numerosi neurotrasmettitori e neuromodulatori e questo è dimostrato anche dalla contiguità di fibre nervose con l'urotelio (Fig. 3a) È stato inoltre dimostrato che le stesse cellule epiteliali possono rilasciare delle sostanze che sono in grado di modulare i segnali afferenti vescicali (Lewis, 2000; Apodaca et al, 2007).



**Fig. 3a.** A sinistra disegno schematico che illustra l'intima connessione tra fibre nervose afferenti (in rosso) ed efferenti (in blu) e l'urotelio. Modificato da Birder e de Groat (2007). 1r A destra micrografia di vescica di cavia in cui la fibre nervose e le cellule dello strato basale dell'urotelio (frecche) sono state identificate mediante reazioni immunostochimiche: in rosso fibre immunoreattive per la colina acetiltransferasi. In verde cellule epiteliali immunoreattive per l'enzima ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS); questo enzima sintetizza la molecola gassosa ossido nitrico (NO, vedi fig. 1 s). Modificato da Gillespie et al. (2006).

### **Risposta dell'urotelio alle fasi di riempimento e svuotamento**

Un'area della biologia cellulare che sta ancora stimolando l'attenzione dei ricercatori è la risposta dell'uroepitelio ai cambiamenti ciclici della pressione idrostatica durante la fase di riempimento e di svuotamento delle vescica. Nella vescica dei mammiferi, l'aumento della pressione interna avviene in modo trifasico. Nella prima fase vi è un rapido aumento della pressione; questa poi rimane relativamente costante per un lungo periodo di tempo; questa rappresenta la seconda fase, detta di stoccaggio (Levin R. e Wein A. 1982; Levin RM. et al. 1990); segue la fase della minzione, che è caratterizzata da un rapido aumento della pressione della vescica, scandito da grandi picchi pressori che sono il risultato della contrazione della muscolatura liscia. Una volta che è avvenuto lo svuotamento, la pressione torna a livelli basali e il processo può ricominciare. Una funzione fondamentale dell'uroepitelio è quella di mantenere il ruolo di barriera a fronte di queste variazioni di pressione idrostatica.

Sono due i processi attraverso i quali l'uroepitelio affronta l'aumento del volume delle urine. Il processo principale si svolge sulla superficie della mucosa che si presenta altamente pieghettata quando la vescica è vuota e consiste in una distensione della parete stessa. L'altro processo, invece, si verifica a livello cellulare e comporta cambiamenti nella morfologia e nella funzione dell'uroepitelio. Quando la vescica si riempie, infatti, le *umbrella cells* subiscono un grande cambiamento morfologico che progressivamente

le porta ad assumere una forma cuboidale; l'uroepitelio di conseguenza diventa più sottile, apparentemente a causa del fatto che le cellule intermedie e basali vengono spinte lateralmente per accogliere l'aumento del volume di urina (Hicks,1975; Apodaca, 2004; Apodaca et al. 2007).

L'uroepitelio è stato a lungo considerato un semplice rivestimento cellulare impermeabile, con elevata plasticità, atto a consentire la conservazione delle urine. La maggior parte degli studi sul tratto urinario inferiore si sono così concentrati sulla muscolatura della vescica e sulla sua innervazione.

La membrana citoplasmatica associata con le regioni “cerniera” (le zone dove sono presenti le *tight junctions*) è in effetti altamente impermeabile anche ai detergenti relativamente forti come il *sarcosile* (*N*-metilglicina, aminoacido normalmente presente nei muscoli) (Liang, et al. 1999). Oggi sappiamo che questa impermeabilità, già descritta 30 anni fa, può essere dovuta alla composizione lipidica inusuale di questa membrana, che è ricca di colesterolo, fosfatidilcolina, fosfatidil-etanolamina e cerebrosidi; un profilo lipidico simile alla mielina (Hicks, et al. 1974).

### **Sensibilità al riempimento vescicale: *cross-talk* tra l'uroepitelio e il sistema nervoso**

Una crescente letteratura mette in evidenza che gli epitelii sottoposti a stimoli meccanici, come quelli che rivestono l'intestino, le vie aeree del polmone e le vie del tratto urinifero inferiore, ricevono e trasmettono segnali alle fibre nervose presenti nella sottomucosa (Burnstock, 2001; Cooke et al 2002;); nel caso della vescica ci sono prove che l'uroepitelio può comunicare il senso di ripienezza al sistema nervoso sottostante attraverso un segnale paracrino che coinvolge il rilascio di ATP (Cook, et al. 1998; Cockayne, et al 2000; Burnstock, 2001).

La trasmissione dei segnali tra le cellule uroepiteliali e i processi nervosi afferenti hanno un'intrigante distribuzione nella vescica (Cockayne, et al 2000; Souslova, et al., 2000). Questi processi nervosi rivelano diverse attitudini. Di recente è stato infatti dimostrato che i recettori purinergici (P2X3) che presenti nei processi nervosi (Lee, et al. 2000) sono implicati in alcune forme di nocicezione e nella percezione del calore (Cook, et al. 1998; Cockayne, et al 2000; Souslova, 2000;). È stato, inoltre, proposto che le molecole di ATP rilasciate dall'uroepitelio durante il riempimento della vescica si leghino ai recettori P2X3

presenti sulle fibre afferenti e che questo consenta la percezione dello stato di riempimento della vescica (Cockayne, et al 2000; Burnstock, 2001;).

Coerentemente con questo modello, vi sono studi che evidenziano come l'uroepitelio rilasci ATP in risposta ai cambiamenti di pressione (Apodaca, 2004). Tuttavia, anche l'ATP rilasciata da altri tipi cellulari, come le cellule muscolari lisce, può contribuire a segnalare questa sensazione (Namasivayam S., 1999). L'ATP-epiteliale si lega in modo paracrino ai recettori P2X3 sui processi nervosi afferenti. Questo legame attiva una doppia funzione: da un lato, aumenta la possibilità dell'epitelio di ospitare più urina, dall'altro, comunica lo stato di completo riempimento della vescica al sistema nervoso.

La comunicazione tra l'uroepitelio e le fibre che innervano la vescica è probabilmente bidirezionale. Accanto al rilascio di neurotrasmettitori come ATP e ossido nitrico (NO) (Birder, et al. 1998; Apodaca, 2004; Birder, et al. 2002;), le cellule uroepiteliali presentano anche recettori espressi in modo caratteristico dai neuroni sensitivi, come il recettore per la capsaicina (TRPV1) e il recettore beta-adrenergico (Birder, et al. 2002;). Anche le efferenze vescicali possono rilasciare ATP, così come possono liberare neurotrasmettitori/neuromodulatori peptidici. Il legame di questi neurotrasmettitori all'uroepitelio potrebbe avvenire per via paracrina e stimolare il cambiamento nelle *umbrella cells*.

L'uroepitelio è parte essenziale di una *sensory web* e riceve informazioni sensitive attraverso i canali e i recettori ad esso associati. Queste informazioni stimolano il *turnover* dello strato più superficiale delle *umbrella cells* e il rilascio di *output* sensitivi dall'uroepitelio nella forma di neurotrasmettitori e mediatori che a loro volta comunicano i cambiamenti dell'uroepitelio ai tessuti sottostanti, modificandone la funzione (Veranic e Jezernik, 2000; Apodaca, et al. 2007).

Le fibre afferenti *capsaicin-sensitive transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1* (TRPV1)-positive sono localizzate vicino e all'interno dell'urotelio; sono a stretto contatto con i vasi sanguigni e le cellule muscolari lisce. I processi periferici dei neuroni sensitivi posseggono anche una funzione "efferente"; infatti in questi terminali sono stoccate vescicole contenenti neurotrasmettitori e neurotrasmettitori (come ad esempio SP e CGRP) che possono agire sul target periferico (Maggi, 1990; Birder e de Groat, 2007). A ridosso dell'urotelio sono state anche osservate fibre colinergiche e adrenergiche, cosa che può indicare la presenza di una innervazione efferente. Nella

cavia, in prossimità dell'uroepitelio, si possono osservare fibre sensitive immunoreattive, ma non in quelle efferenti. Nello spazio suburoteliale si trovano anche miofibroblasti che comunicano tra loro tramite *gap junctions* e sono in intimo contatto con le fibre nervose (Gillespie, 2006); queste cellule sono sensibili ai neurotrasmettitori come l'ATP, rilasciati dai nervi o dalle cellule epiteliali. Ciò suggerisce un loro ruolo come mediatori nelle interazioni tra uroepitelio e sistema nervoso (Brading e McCloskey, 2005).

### ***Sensory Web* associato all'uroepitelio**

Nuovi dati evidenziano che l'uroepitelio non è, dunque, solo una barriera passiva, ma è parte integrante del *sensory web*. Il *web* include l'uroepitelio, le fibre nervose intimamente associate, le cellule interstiziali (miofibroblasti), i mastociti e le cellule muscolari lisce del detrusore e dello sfintere vescicale interno. La funzione primaria della *sensory web* è quella di coordinare l'attività della vescica e dei tessuti ad essa associati (Apodaca et al. 2007).

### **Percorsi dell'informazione sensitiva**

L'urotelio è sottoposto a stimoli di diversa natura: meccanici (distensione della parete), chimici (mediatori solubili come il fattore di crescita epiteliale; EGF), neurochimici (ATP, adenosina, SP, acetilcolina, noradrenalina). I mediatori e i neurotrasmettitori sono rilasciati dalle fibre nervose e/o da altri tipi di cellule, incluse quelle uroepiteliali. Il progredire della ricerche di settore sta permettendo di identificare un sempre maggior numero di recettori e canali ionici a livello di cellule uroepiteliali, come ad esempio: la famiglia dei recettori per i fattori di crescita epiteliale EGF ErbB1-3 (epidermal growth factor receptor; EGFR; ErbB-1; HER1 nell'uomo); i recettori per l'adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>3a</sub>, A<sub>3b</sub> e A<sub>3</sub>; i recettori  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenergici; i recettori per le bradichinine; i recettori per le neurochinine; i recettori nicotinici e quelli muscarinici (M1-M5); i recettori purinergici P2X e P2Y; i recettori attivati dalle proteasi; i canali epiteliali per il sodio e la famiglia dei canali *transient receptor potential* TRP come il TRPV1, TRPV2, TRPV4 e TRPM8, famiglia di recettori costituiti da canali ionici, coinvolti nella nocicezione (Fig. 3b).

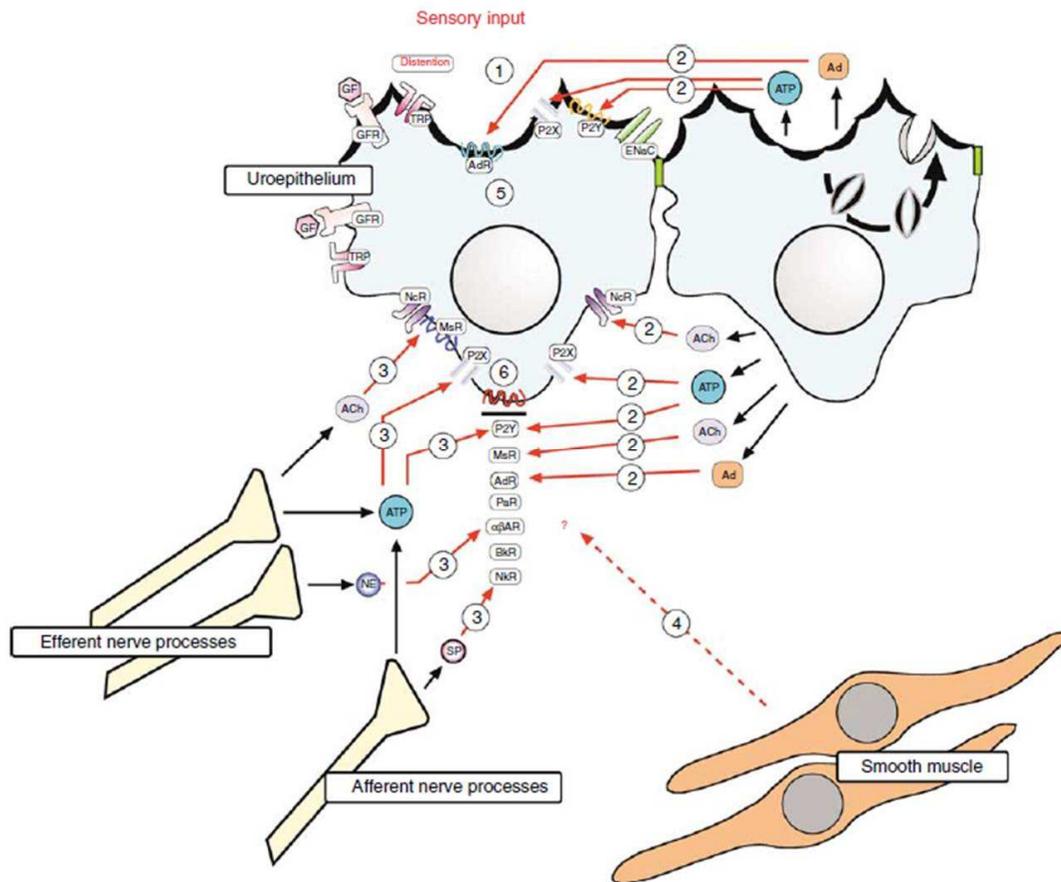


Fig. 3b. La sensory web associata all'uroepitelio. Gli *input* sensitivi possono essere o la distensione della vescica durante il riempimento, o mediatori solubili che si trovano nell'urina (1) o quelli rilasciati dall'uroepitelio (2), o i processi nervosi afferenti/efferenti adiacenti (3), o le cellule del muscolo liscio agiscono come *inputs* sensitivi per stimolare recettori/canali della superficie cellulare presenti sulla superficie apicale delle *umbrella cells* (5), le superfici basolaterali delle *umbrella cells* (6) e le membrane plasmatiche delle sottostanti cellule intermedie e basali. Per chiarezza, gli strati di cellule intermedie/basali e le cellule interstiziali non sono mostrati, ma è probabile che giochino un ruolo significativo nella meccanismi di comunicazione del *sensory web* (immagine modificata da Apodaca et al, 2007).

### Impatto degli stimoli sulla funzione dell'uroepitelio

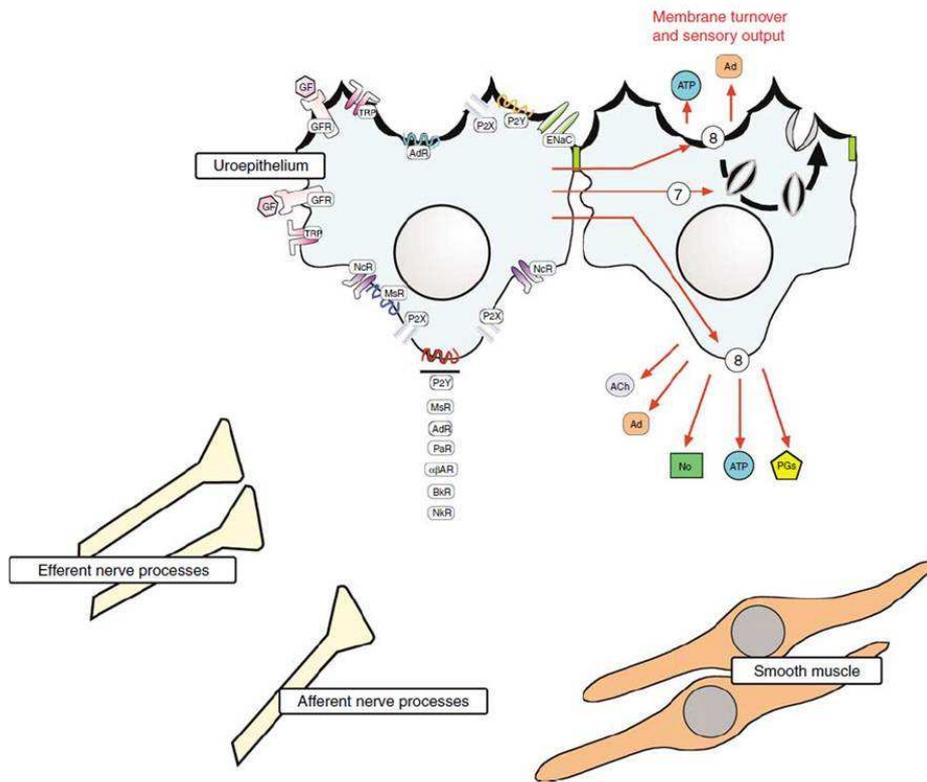
Stimolazioni di varia natura sull'uroepitelio possono indurre, nell'epitelio stesso, profondi cambiamenti funzionali, come ad un aumento del traffico di membrana, del trasporto ionico e l'alterazione della funzione di barriera (Lewis e Moura, 1984; Veranic e Jezernik, 2000; Truschelet al, 2002; Wang et al. 2003). L'esocitosi e l'endocitosi giocano un ruolo importante nel *sensory web* perché questi percorsi regolano la composizione dei recettori e dei canali sulla superficie delle *umbrella cells* e di altre cellule uroepiteliali. In particolare, l'esocitosi ha probabilmente un ruolo nel rilascio dei

mediatori dall'uroepitelio consentendo in questo modo la comunicazione anche con altri tipi cellulari nel *sensory web* (Wang et al. 2005; Yu et al. 2006).

Il riempimento della vescica non stimola solo l'esocitosi, ma anche l'endocitosi, sebbene l'effetto netto della distensione sia quello di un aumento dell'area della superficie. Oltre alla distensione e all'ATP, non sono ancora noti gli altri stimoli e i segnali a cascata che regolano l'endocitosi. Può sembrare contro intuitivo che la pressione idrostatica induca simultaneamente sia l'esocitosi che l'endocitosi; bisogna però considerare che l'esocitosi indotta dalla pressione idrostatica verosimilmente modula l'aumento dell'area della superficie apicale prodotta dell'esocitosi, assicura il *turnover* dei componenti della membrana e, cosa molto importante per il *sensory web* associato all'uroepitelio, regola il numero e la funzione dei recettori e dei canali sulla superficie della cellula (Apodaca et al. 2007).

### **Output sensitivi dall'uroepitelio**

Oltre a stimolare il traffico di membrana nell'urotelio, gli *input* sensitivi possono stimolare il rilascio di *output* sensitivi dell'uroepitelio, tra cui fattori di crescita, neurotrasmettitori e altri mediatori. Gli *output* sensitivi, una volta rilasciati, probabilmente agiscono in modo autocrino per modificare ulteriormente la funzione epiteliale, ma possono agire anche in modo paracrino per modulare altre cellule e tessuti associati ad un *sensory web* inteso in senso più ampio. *Output* sensitivi potenzialmente importanti prodotti dall'uroepitelio sono: acetilcolina, adenosina, ATP, NO e prostaglandine (Ferguson et al. 1997; Cockayne et al. 2000; Birder e More, 2005; Gillespie et al. 2005; Wang et al. 2005; Lewis e Lewis; Yu et al. 2006; Birder et al. 2006). Altri studi hanno dimostrato che l'uroepitelio può modulare l'attività spontanea del muscolo liscio o la contrazione muscolare, probabilmente attraverso il rilascio di un fattore solubile. L'ossido nitrico (NO) è rilasciato dall'uroepitelio in risposta alla noradrenalina, alla capsaicina e all'isoproterenolo e può avere diverse funzioni come il rilasciamento del muscolo liscio, la modulazione di funzioni nervose afferenti ed efferenti e la regolazione di barriera dell'uroepitelio. L'adenosina prodotta dall'uroepitelio, rilasciata da entrambe le superfici cellulari, gioca un ruolo determinante nel modulare la funzione sensitiva afferente e la contrazione del muscolo liscio (Fig. 3c).



**Fig. 3c.** La sensory web associata all'uroepitelio. *Tour over* di membrana e *output*. Al legame recettoriale o all'attivazione del canale seguono dei cambiamenti nell'uroepitelio, incluso il turnover di membrana (cioè esocitosi/endocitosi) nella membrana plasmatica apicale della *umbrella cell* (e probabilmente anche in altri domini della membrane citoplasmatica delle cellule dell'uroepitelio) (7) e il rilascio di *output* sensitivi, come acetilcolina, adenosina, ATP, NO e prostaglandine (8) (immagine modificata da Apodaca et al, 2007).

### Percorsi di *signaling* transmurale

*Input* sensitivi sulla superficie apicale dello strato delle *umbrella cells* possono regolare la funzione della vescica attraverso un percorso di *signaling* transmurale.

Alcuni studi mostrano che la somministrazione intravesicale di carbacol, nicotina, composti vanilloidi e ossiemoglobina (eliminatore di NO) ha effetti sulla funzione della vescica. Di conseguenza, diversi mediatori e percorsi di *input* ad essi associati possono stimolare il *signaling* transmurale nell'uroepitelio. In alcuni studi clinici è stato dimostrato che la somministrazione intravesicale di composti vanilloidi produce effetti benefici in pazienti con patologie della vescica quali la cistite interstiziale e l'iperattività neurogena del detrusore e che la somministrazione intravesicale di ossiemoglobina ha come

risultato una iperattività della vescica; ciò evidenzia che l'ossiemoglobina ha un ruolo inibitorio per l'NO nel controllo dei riflessi della vescica.

## Capitolo 3

### Centri nervosi coinvolti nell'innervazione estrinseca della vescica

#### Centro pontino della minzione (*pontine micturition center, PMC*)

(nucleo di **Barrington** o regione **M**)

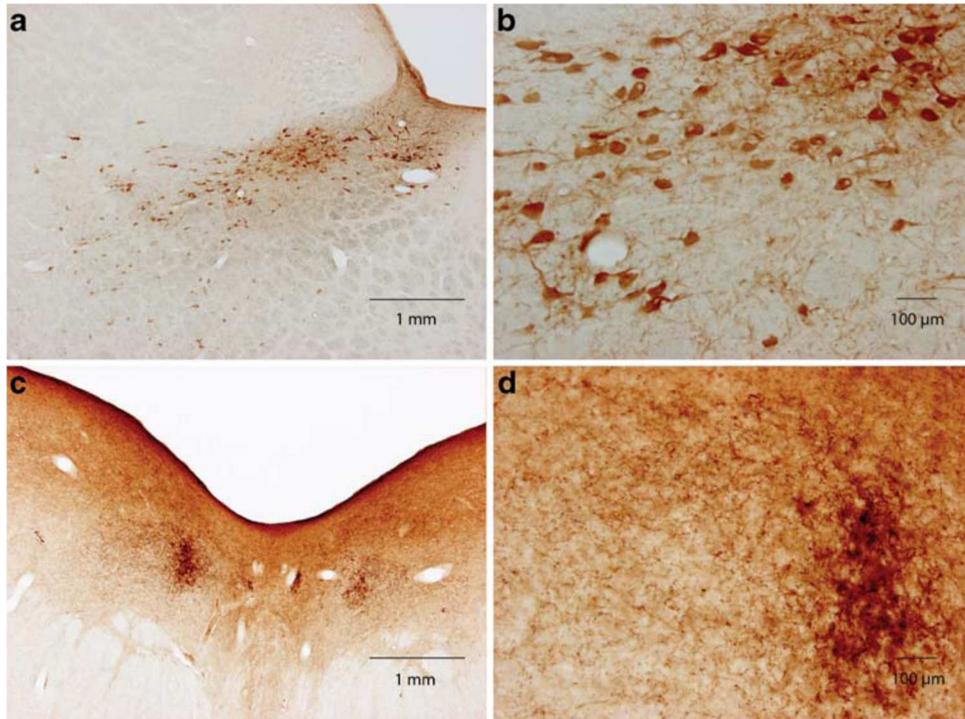
Il PMC venne scoperto da Barrington (1925) nel tegmento pontino dorso-laterale di gatto; in questa sede, Barrington notò un gruppo di neuroni che, in seguito a lesioni bilaterali del tegmento dorsale pontino, provocava ritenzione urinaria, mentre la sua stimolazione elettrica provocava contrazione vescicale, inibizione dello sfintere esterno dell'uretra (EUS, acronimo che deriva definizione in inglese: *external urethral sphincter*) e rilassamento uretrale. Le ricerche successive a questa prima scoperta sono state numerose e eseguite non solo sul gatto (Holstege et al. 1979, 1986; Blok and Holstege, 1994, 1999; de Groat et al., 1998), ma anche su altre specie.

A tutt'oggi il PMC non è ancora ben definito e in letteratura è descritto spesso come nucleo o centro della minzione, o anche come regione M, dove la 'M' sta ad indicare la sua posizione mediale, nel tegmento pontino, rispetto al centro della continenza o centro dell'accumulo (*storage center*; Regione L).

Studi anatomo-funzionali hanno permesso di identificare e localizzare anche nel suino la regione M (Fig. 3a) (Dalmose et al. 2004; Jensen et al., 2009). Da entrambe le ricerche è emerso che il PMC nella specie suina è collocato nella parte rostrale del tegmento pontino, ventralmente al pavimento del quarto ventricolo, medialmente al *locus coeruleus*, esattamente nella posizione in cui era stato già evidenziato nelle altre specie studiate.

Il PMC svolge la sua azione eccitando direttamente i neuroni pre-gangliari parasimpatici sacrali (Morgan et al. 1981; Blok and Holstege, 1997; Sasaki, 2005), utilizzando come neurotrasmettitore il glutammato (Matsumoto et al., 1995). I neuroni pregangliari parasimpatici innervano la muscolatura liscia della vescica (muscolo detrusore), facendola contrarre. Il PMC completa la sua azione inibendo, per mezzo di interneuroni

GABA-ergici o GLICINergici, i neuroni somatici che controllano il tono della muscolatura striata uretrale (Nucleo di Onuf) (Blok et al.1997; Sie et al. 2001; Holstege et al., 2010).



**Fig. 3a** Microfotografie raffiguranti i neuroni del *locus coeruleus* identificati grazie alla loro immunoreattività per l'enzima tirosina idrossilasi (a-b) e i neuroni del centro della minzione identificati grazie alla loro immunoreattività per il *corticotrophin releasing factor*. Questi neuroni costituiscono l'area densa evidente nelle foto c e d.

La stimolazione elettrica dell'IML provoca un rilassamento dello sfintere (Blok et al. 1998) poiché questi neuroni inibitori proiettano ai motoneuroni somatici dell'EUS (Nadelhaft & Vera, 1996) localizzati nella parte ventrolaterale del nucleo di Onuf (Sato et al., 1978). Perciò il PMC provoca simultaneamente una contrazione della vescica e un rilassamento dell'EUS attraverso stimolazioni eccitatorie discendenti ai motoneuroni pregangliari parasimpatici della vescica e agli interneuroni inibitori nell'IML.

Nel PMC di topo (Willette et al., 1988; Tanaka et al. 2003) e di gatto (de Groat et al., 1998; Sasaki et al., 2005; Sugaya et al., 2003) sono stati identificate diverse tipologie di neuroni le cui funzioni sono correlate alla minzione. Un gruppo di cellule, denominate

neuroni diretti, aumenta la sua attività durante la contrazione della vescica e la diminuisce quando inizia il rilassamento vescicale (Tanaka et al. 2003; de Groat et al., 1998); un secondo gruppo, meno numeroso, è rappresentato dai neuroni inversi, inibiti durante la contrazione vescicale ed attivi nell'intervallo tra le contrazioni. Inoltre, nel PMC si identificano altri due tipi di neuroni: i neuroni *on-off*, che si attivano transitoriamente all'inizio o alla fine della contrazione vescicale, ed i neuroni indipendenti, la cui scarica avviene indipendentemente dalla contrazione della vescica (De Groat et al. 1998).

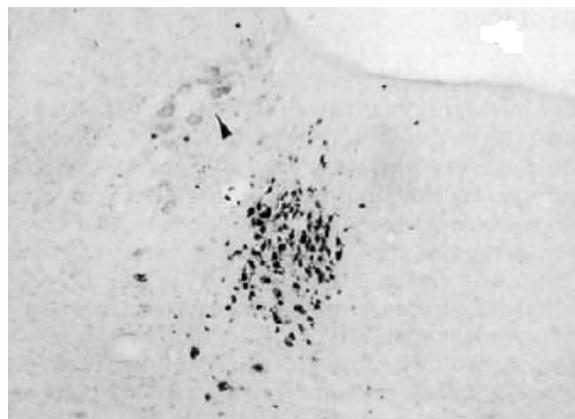


Fig. 3b – Sezione di ponte di ratto in cui sono evidenti i neuroni del PMC marcati a ritroso dal virus della pseudorabbia iniettato nello sfintere esterno dell'uretra. Il virus, dopo 4 giorni di incubazione, è stato ritrovato nelle strutture encefaliche più rostrali. La testa di freccia indica i neuroni del ganglio mesencefalico del trigemino. Modificato da Nadelhaft & Vera, (1996).

### **Il centro della continenza o regione L**

Il centro nervoso che controlla l'accumulo dell'urina viene definito centro pontino della continenza (*pontine urine storage center*) (Griffiths et al., 1990) o regione L (Holstege et al., 1986), perché è localizzato lateralmente al PMC (Sugaya et al., 1998) nel tegmento pontino ventro-laterale. Quest'area invia proiezioni dirette al midollo spinale sacrale (Holstege et al., 1986) e al nucleo di Onuf (Holstege et al., 1979, 1986) (Fig. 3c).

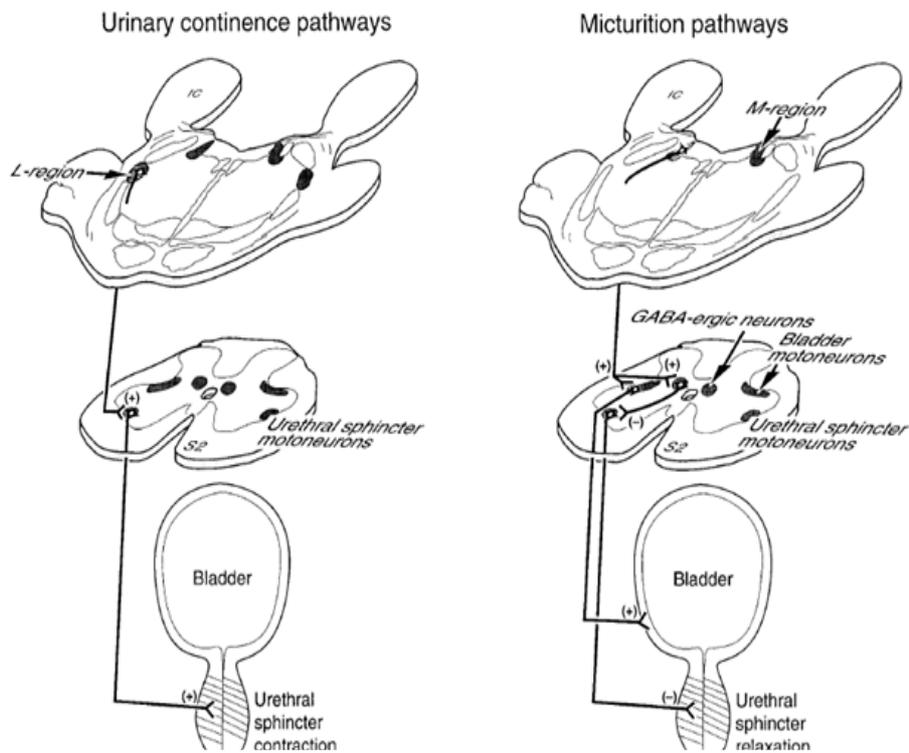


Fig. 3c - Rappresentazione schematica dei circuiti discendenti coinvolti nell'accumulo (a sinistra) e della minzione (a destra). Sono indicati effetti eccitatori (+) ed inibitori (-). Modificato da Blok et al. (1999).

E' stato dimostrato che la stimolazione della regione L del gatto provoca una contrazione del pavimento pelvico e della muscolatura dell'EUS (Holstege et al., 1986).

In seguito a lesioni bilaterali della regione L si osservano gravi forme di incontinenza (Griffiths et al., 1990), capacità vescicale fortemente ridotta ed espulsione precoce dell'urina a causa di un'attività eccessiva del detrusore accompagnata da un rilassamento dell'EUS. Queste osservazioni suggeriscono che durante il riempimento vescicale la regione L eserciti un effetto eccitatore continuo sul nucleo di Onuf che, a sua volta, agendo sull'EUS permette la ritenzione urinaria.

Griffiths et al. (1990) hanno ipotizzato che il rilassamento dell'EUS osservabile durante la minzione possa essere dovuto ad una inibizione della regione L da parte del PMC; tuttavia questa ipotesi funzionale non è convalidata da dati sperimentali che confermino la presenza di una connessione anatomica tra le due regioni. Comunque, sebbene manchino dati morfologici che dimostrino il *cross-talk* fra le due regioni, sono state dimostrate interazioni indirette tra i due nuclei; Blok et al. (1997) hanno infatti dimostrato

che il PMC eccita neuroni inibitori GABA-ergici localizzati nella commissura grigia dorsale del midollo spinale sacrale, i quali, inibendo i neuroni del nucleo di Onuf, provocano il rilassamento dell'EUS (Fig. 3c). In pratica, il PMC inibisce a livello sacrale i motoneuroni del nucleo di Onuf, eccitati invece dalla regione L. Al contrario, la regione L non sembra in grado di inibire i neuroni parasimpatici che innervano il muscolo detrusore (Holstege et al. 1986). Sembra dunque che la regione L non abbia un ruolo vero e proprio durante la minzione, ma che sia attiva nei periodi interposti tra una minzione e l'altra (Block e Holstege, 1999).

Argomento di grande interesse sono le afferenze alla regione L, cioè le aree encefaliche in grado di modulare il centro della continenza. Queste vie afferenti non sono facili da studiare; Blok et al. (1999) hanno comunque dimostrato che il PMC e la regione L agiscono in maniera indipendente e che molto probabilmente sono dotati di circuiti afferenti differenziati. La regione L si ritiene principalmente coinvolta nelle fasi di accoppiamento, dovendo inibire fenomeni di minzione durante l'attività sessuale. Sugaya et al. (1998) hanno dimostrato che il nucleo subceruleo e il nucleo del rafe mediano sono strettamente coinvolti sia nell'accumulo di urina che nell'erezione peniena; le loro funzioni sono così coordinate e controllate che nei soggetti che presentano erezione del pene si sviluppa anche la continenza urinaria.

### **La sostanza grigia periacqueduttale (*periaqueductal grey*, **PAG**)**

Holstege et al. (1986) hanno messo in luce la stretta correlazione tra l'attivazione del PMC e la minzione. Il controllo del PMC è un argomento di primaria importanza dato che la sua stimolazione, encefalica o artificiale, provoca la minzione. Il PMC non riceve infatti stimoli diretti dal midollo spinale sacrale, ma è bersaglio di impulsi molto forti provenienti dal PAG (Kuipers et al., 2005) (Fig. 3d).

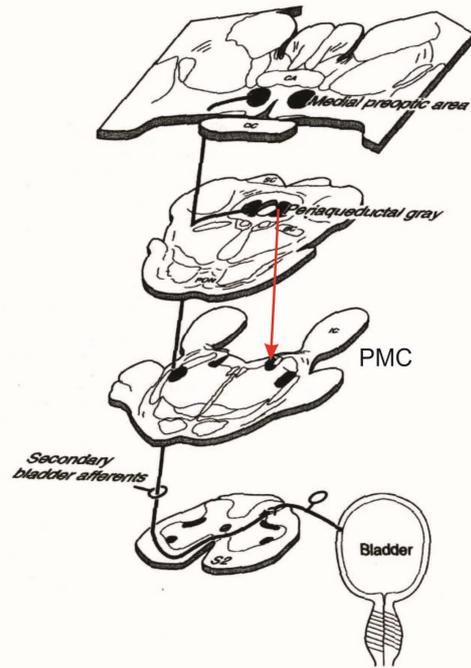


Fig. 3d – Schema che illustra il percorso delle afferenze vescicali per raggiungere il PAG mesencefalico. Dal PAG partono gli stimoli (freccia rossa) che raggiunto il PMC sono in grado di evocare il riflesso della minzione. Modificato da Block & Holstege (1998).

Il PAG riveste un ruolo di grande importanza nella gestione del riflesso della minzione anche nell'uomo, dove è stato dimostrato che una piccola lesione nella parte destra del PAG causa una forte ritenzione urinaria (Yaguschi et al. 2004). Si ritiene che il PAG sia organizzato in modo tale che la sua area centrale riceva le afferenze direttamente dal midollo spinale sacrale, mentre i neuroni residenti nelle aree più laterali inviano stimoli al PMC; le afferenze vescicali vengono quindi elaborate nel PAG che in seguito attiva il PMC.

Il PAG riceve un flusso continuo di informazioni provenienti dalla vescica relative allo stato di riempimento. Quando viene percepito il raggiungimento di un volume soglia di riempimento, da questo centro nervoso partono stimoli che attivano il PMC. L'attivazione del PMC non è dovuta, però, soltanto alla stimolazione del PAG ad opera del riempimento. Molte altre regioni dell'encefalo, infatti, hanno diretto accesso al PAG, come ad esempio le parti laterale, caudale ed anteriore dell'ipotalamo, la regione preottica mediale e laterale, il nucleo centrale dell'amigdala, il nucleo del letto della stria terminale ed una grossa porzione della corteccia prefrontale (Andrew e Nathan, 1964). Si ritiene che queste strutture siano attivate al fine di provvedere alla sicurezza ambientale

ideale per la minzione. Se non esistono tali condizioni, questi centri inibiscono l'attivazione del PMC da parte del PAG.

### **Aree cerebrali che influenzano il centro della minzione**

La minzione è controllata da un sistema definito *spinal-brain stem-spinal system*, nel quale l'informazione sul riempimento vescicale è trasmessa ai neuroni del midollo spinale sacrale, che a loro volta trasmettono questa informazione alla parte centrale del PAG. Altri gruppi di cellule nella parte dorso-mediale, e specialmente in quella laterale del PAG, attivano il PMC quando è necessario che si effettui la minzione (Blok et al. 1994; Kuipers et al. 2005). La decisione di iniziare il processo della minzione deriva dal PAG ed è basata su informazioni afferenti dal midollo spinale sacrale e da strutture cerebrali. Questo è molto importante per gli animali perché lo stimolo della minzione in condizioni di rischio, come un combattimento, deve essere bloccato.

Che relazione c'è tra le emozioni e la minzione? La funzione più importante della minzione è quella di svuotare la vescica in modo da eliminare l'urina, un liquido che contiene varie sostanze. Mentre nell'uomo l'urina non ricopre più ruoli importanti dal punto di vista della comunicazione interspecifica, nell'animale gioca ruoli fondamentali. Molte specie, infatti, usano la minzione come un importante segnale sessuale e per marcare il proprio territorio; quindi l'urina non deve essere eliminata solo quando la vescica è piena, ma anche quando è necessario per altri processi della vita di relazione dell'animale; per questa ragione, la minzione non è strettamente correlata a riflessi spinali ma è sotto lo stretto coordinamento dell'encefalo (Holstege, 2005).

Nel gatto le afferenze vescicali terminano su un gruppo di cellule situate nella parte laterale del corno dorsale, dove, tra l'altro, si trovano anche i dendriti delle cellule parasimpatiche sacrali pre-gangliari. I neuroni di questo gruppo di cellule inviano informazioni inerenti lo stato di replezione della vescica al PAG, ma non direttamente al talamo; questo spiega la mancanza di consapevolezza delle varie fasi di replezione. Le afferenze vescicali non eccitano mai direttamente i neuroni del PMC, perché questo avviene ad opera degli interneuroni del PAG (Holstege, 2005). È perciò evidente che esistono, all'interno del PAG, anche cellule che fungono da interneuroni. È altrettanto evidente che le varie sottopopolazioni si scambiano informazioni determinanti al fine di organizzare la minzione e che il PAG e il talamo si interfacciano al fine di avere la

consapevolezza del raggiungimento del livello soglia nella fase di replezione. Il PMC stimola direttamente, attraverso fasci discendenti, i motoneuroni parasimpatici della vescica e gli interneuroni inibitori GABA-ergici (Blok et al. 1997a) e glicinerfici (Sio et al., 2001) a livello sacrale che inibiscono i motoneuroni del nucleo di Onuf (Blok et al., 1998a) i quali, a loro volta, innervano lo sfintere esterno striato della vescica. La stimolazione del PMC causa dunque la contrazione della vescica e il rilassamento dello sfintere vescicale. Oltre al PAG, solo l'area pre-ottica (ipotalamo) e il gruppo di cellule localizzate nella parte caudale dell'ipotalamo mandano impulsi direttamente al PMC, quindi molte strutture utilizzano il PAG per comunicare con il PMC (Zermann et al. 1998).

Le connessioni tra le basse vie urinarie e il sistema nervoso centrale sono state studiate nel ratto (Nadelhaft & Vera, 1996). Gli Autori, grazie all'iniezione del virus della pseudorabbia (PRV) nella parete vescicale e nello sfintere uretrale esterno, hanno tracciato le principali vie nervose che governano le funzioni di accumulo e di evacuazione della vescica urinaria. Il PRV migra rapidamente verso il midollo spinale (2-4 giorni) percorrendo le vie nervose rappresentate dai nervi pelvico e ipogastrico (vescica) e dai nervi pudendo, pelvico e ipogastrico (uretra); dai centri sacrali il virus migra, oltrepassando le barriere sinaptiche, verso le aree nervose superiori che si suppone essere deputate al controllo della minzione. Gli Autori sono stati in grado di identificare, grazie ad opportune reazioni di immunoistochimica, i neuroni coinvolti in questi circuiti. I risultati ottenuti da questi brillanti studi sono schematizzati nelle figure 3e e 3f.

Zermann et al. (1998), utilizzando la stessa tecnica di Nadelhaft e collaboratori, hanno iniettato il trigono vescicale ottenendo risultati sovrapponibili. Numerosi neuroni raggiunti dal PRV sono stati osservati nel midollo spinale sacrale (neuroni pre-gangliari parasimpatici) e toracico (neuroni pre-gangliari simpatici), al livello di lamina X e di IML (Fig. 3g) e nel PAG (Fig. 3h).

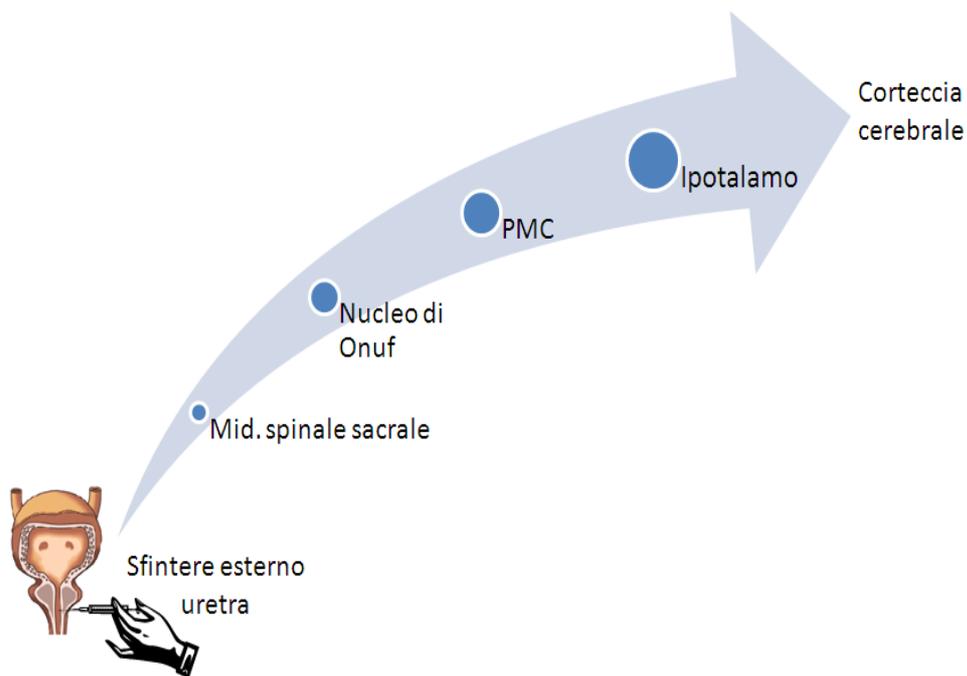


Fig. 3e – Il diagramma illustra la sequenza di coinvolgimento delle strutture nervose dopo iniezione del virus della pseudorabbia nello sfintere esterno dell'uretra di ratto. Elaborato sui dati di Nadelhaft & Vera (1996).

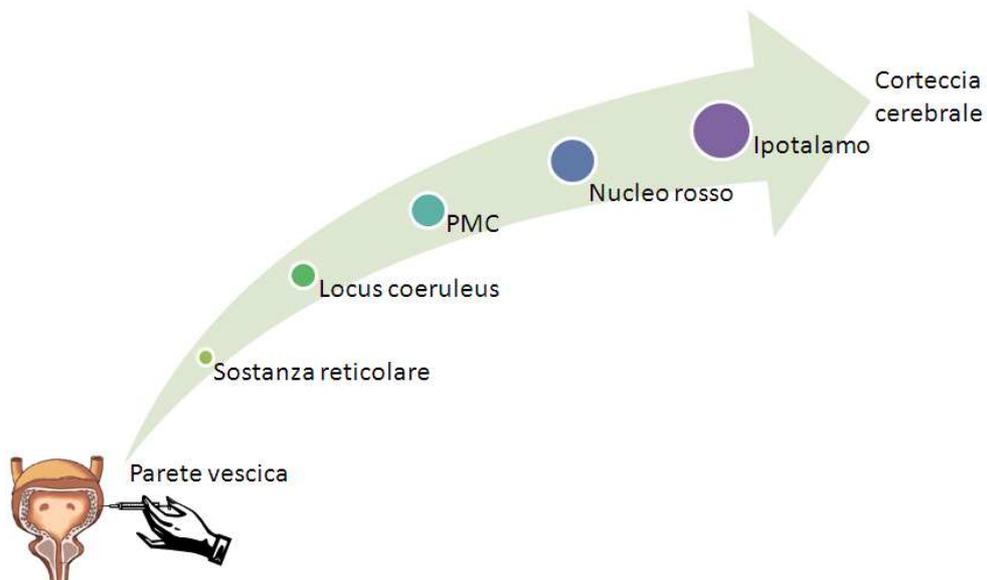
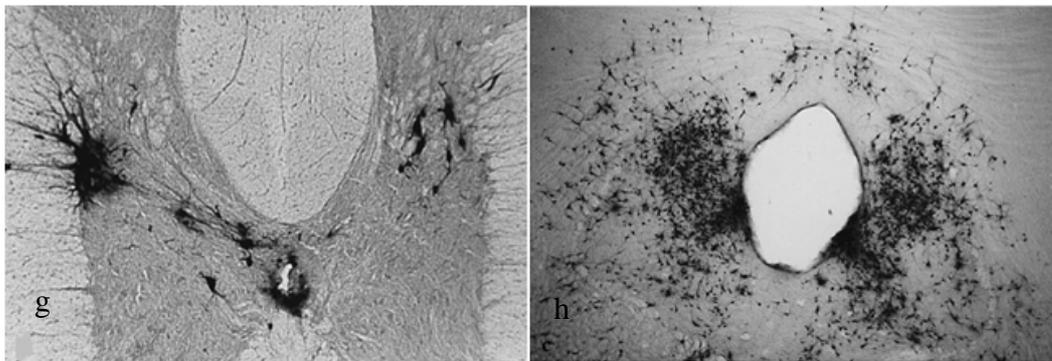


Fig. 3f – Il diagramma illustra la sequenza di coinvolgimento delle strutture nervose dopo iniezione del virus della pseudorabbia nella parete della vescica di ratto. Elaborato sui dati di Nadelhaft & Vera (1996).

Altri neuroni sono stati osservati nei nuclei del rafe; è stato dimostrato che questi neuroni inviano numerose fibre a vari livelli nel midollo spinale, come ad esempio ai neuroni pre-gangliari simpatici e parasimpatici della IML. È possibile supporre che, inoltre, i neuroni del rafe proiettino ai neuroni della lamina X del midollo spinale toraco-lombare (Du, 1989) e ai neuroni del corno dorsale (Zermann et al., 1998). Gli Autori hanno evidenziato marcature anche nel *locus ceruleus*, un centro nor-adrenergico in grado di inviare fibre al corno dorsale ed al corno ventrale del midollo spinale, ma non all'IML (Nygren, 1977). Cellule marcate sono state osservate anche nel nucleo rosso, che invia fibre a numerosi distretti del midollo spinale sino ai tratti lombo-sacrali (Chiocchetti et al., 2006).



**Fig. 3g-h** g) La figura mostra una sezione del midollo spinale (T13) di ratto in cui sono evidenti numerosi neuroni della lamina X e della colonna intermedio laterale (IML) immunopositivi per il virus della Pseudorabbia. h) La figura mostra una sezione del mesencefalo di ratto in cui sono evidenti numerosi neuroni del grigio periacqueduttale (PAG) immunopositivi per il virus della Pseudorabbia. Modificato da Zermann et al. (1998).

Il nucleo paraventricolare ipotalamico è stato abbondantemente raggiunto dal PRV, cosa resa evidente dalla marcatura. È noto che il nucleo paraventricolare invia numerose efferenze ai segmenti L6-S1 del midollo spinale (Burstein et al., 1990) ed agisce come stazione di coordinamento per le attività viscerali simpatica e vagale (Zermann et al., 1998).

Un'altra regione in cui è stato rinvenuto il PRV è l'area preottica mediale, che, pur non presentando connessioni dirette con il midollo spinale, invia numerose proiezioni all'ipotalamo, al PMC e ad altre regioni del tronco encefalico (Rizvi et al., 1994). Insieme al nucleo ipotalamico paraventricolare, quest'area è coinvolta nel controllo di differenti

funzioni viscerali, come ad esempio la termoregolazione, la circolazione, l'attività sessuale, la respirazione ed il bilancio idrico. Anche la corteccia, come già dimostrato dal gruppo di Nadelhaft, viene ben rappresentata dalle "marcature" con il virus. La corteccia può proiettare le proprie fibre al midollo spinale sia direttamente, attraverso la via cortico-spinale, modesta nei nostri animali, che indirettamente, attraverso l'interposizione di nuclei molto importanti, come ad esempio il nucleo rosso.

La marcatura dei neuroni corticali è inoltre da mettere in relazione alle varie funzioni di controllo che la corteccia esercita sulle diverse funzioni vegetative. Nonostante nell'uomo la minzione non ricopra ruoli di demarcazione territoriale e non sia espressione di comportamenti sessuali, questa funzione viene controllata da regioni sopraspinali; il fatto stesso che l'encefalo sia così importante nel controllo della minzione comporta uno dei più gravi disturbi nella società moderna: l'*overactive bladder* (OAB). L'OAB è un disturbo centrale causato da lesioni delle aree encefaliche che influenzano il PMC. Questo è un grave problema sociale perché lo stimolo della minzione è così frequente che le persone non riescono a dormire a sufficienza o a lavorare con continuità, vista la continua necessità di mingere.

Il nucleo retrombiguale, localizzato nella parte caudale del midollo allungato (Holstege & Tan, 1987) e, a seconda della specie, nei primi segmenti del midollo spinale cervicale (Chiocchetti et al. 2003), è coinvolto nel controllo dei muscoli della parete addominale che regolano la pressione intra-addominale ed ha proiezioni sul nucleo di Onuf che probabilmente giocano un ruolo nel controllo della minzione (Sato et al. 1978). Questo circuito esistente tra il nucleo retroambiguo e il nucleo di Onuf potrebbe essere parte in causa nell'incontinenza da stress, in cui la debolezza dello sfintere vescicale farebbe sì che l'urina sia espulsa durante aumenti di pressione intraddominale dovuti all'esecuzione dei normali movimenti del fisico.

### **Il nucleo di Onuf**

Bronislaw Onuf-Onufrowicz, brillante studente russo di origine polacca (1863-1928) emigrò negli Stati Uniti nel lontano 1890 per diventare in seguito uno dei più noti neuropatologi del suo tempo. La sua fama dura tutt'oggi per aver identificato un gruppo di neuroni, localizzato nelle corna ventrali del midollo spinale sacrale (S2-S4) di uomo, coinvolto nella continenza urinaria e defecatoria, così come nelle complesse attività

contrattili dell'organismo durante l'accoppiamento. Questo nucleo, definito *nucleo X* dallo stesso Onufrowicz, fu successivamente ribattezzato nucleo di Onuf. Nel secolo scorso, così come recentemente, numerosi sono stati gli studi estesi alle varie specie animali incentrati sul nucleo di Onuf. Esperimenti di marcatura retrograda in gatti, cani, conigli e sub-primati hanno identificato un nucleo omologo al nucleo di Onuf e mostrato la diretta connessione dei suoi neuroni con gli sfinteri esterni dell'uretra e dell'ano tramite il nervo pudendo (Sato et al. 1978; Nagashima et al., 1979; Kuzuhara et al., 1980; Roppolo et al., 1985). L'anatomia e la fisiologia del nucleo di Onuf sono interessanti: i suoi neuroni sono simili ai motoneuroni destinati ai muscoli degli arti (Mannen et al. 1977) ed innervano la muscolatura striata a controllo volontario degli sfinteri suddetti, presentando anche simili caratteristiche ultrastrutturali anche a livello di giunzione neuromuscolare. Queste caratteristiche fanno sì che il Nucleo di Onuf sia identificato come nucleo somatico; stranamente, però, questo nucleo condivide anche alcune caratteristiche tipiche dei neuroni del sistema nervoso autonomo. I suoi neuroni ricevono infatti fibre mesencefaliche indirizzate anche ai neuroni pregangliari parasimpatici sacrali (Holstege & Tan, 1987). Nelle patologie del sistema nervoso autonomo, come ad esempio la sindrome di Shy-Drager (Sung et al. 1979), i neuroni del nucleo di Onuf degenerano, come degenerano i neuroni pre-gangliari del sistema nervoso autonomo. Diversamente, nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA), che colpisce specificamente i neuroni motori somatici, il nucleo di Onuf è solo relativamente danneggiato (Mannen, 1977; Sasaki e Maruyama, 1993) e gli sfinteri esterni di ano e uretra si conservano integri, almeno sino alle fasi più gravi della malattia (Mannen, 1991). Questi dati dimostrano che i neuroni del nucleo di Onuf presentano caratteristiche intermedie e che si comportano quindi sia da motoneuroni somatici che da neuroni pre-gangliari.

In molti Mammiferi, uomo compreso, il nucleo di Onuf è generalmente diviso in una regione dorso-mediale (DM) e una ventro-laterale (VL) (Sato et al. 1978; Nadelhaft et al., 1996). La componente VL è responsabile dell'innervazione della muscolatura striata dello sfintere uretrale esterno. La componente DM è invece responsabile della contrazione dello sfintere anale esterno. Queste due componenti possono essere molto distanti, come nel ratto, (Fig. 3i) oppure essere più o meno ravvicinate (Fig. 3j).

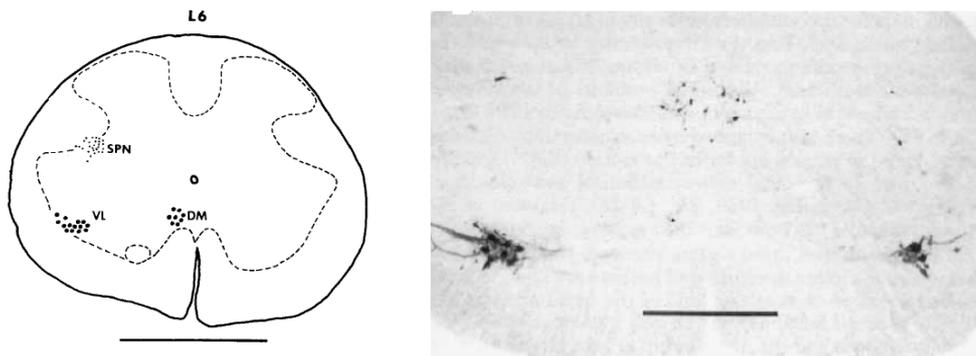


Fig. 3i Lo schema a sinistra mostra la posizione, nel midollo spinale L6 di ratto, delle due componenti del nucleo di Onuf; la componente ventro-laterale (VL) è responsabile dell'innervazione della muscolatura scheletrica dello sfintere uretrale esterno. La componente dorso-mediale (DM) è invece responsabile della contrazione dello sfintere anale. Abbreviazioni: SPN, neuroni pregangliari del nucleo parasimpatico sacrale; Barra = 1 mm. Nella micrografia di destra si notano i neuroni della componente VL marcati a ritroso con il virus della pseudorabbia. Barra = 1 mm. Modificato da Nadelhaft et al. (1996).

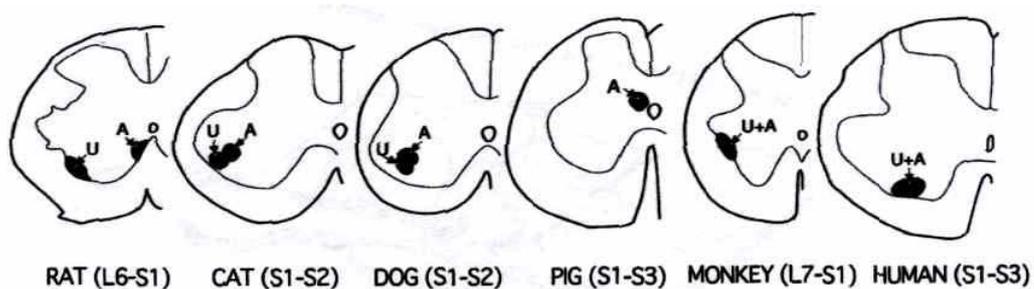


Fig. 3j. Rappresentazione schematica della localizzazione del nucleo di Onuf in differenti Mammiferi. In parentesi sono indicati anche i tratti del midollo spinale sede del nucleo. Con la lettera U si indica la componente destinata all'innervazione dello sfintere esterno dell'uretra, mentre con la lettera A si indica la componente dedicata allo sfintere anale esterno. Notare come nel maiale la posizione del nucleo di Onuf è alquanto differente dalle altre specie. Modificato da Block & Holstege (1998).

Nel gatto l'utilizzo di traccianti retrogradi, iniettati negli sfinteri uretrale esterno ed anale esterno, ha dimostrato marcatura retrograda dei neuroni del nucleo di Onuf. I neuroni marcati si estendono dal segmento medio-caudale di S1 a tutto il segmento S2 (Pullen, 1988). In questa specie la lunghezza del nucleo di Onuf è simile a quella riscontrata nell'uomo (2,6-8 mm) (Thor et al., 1989; Sasaki et al., 1993); la densità si presenta costante eccetto che nella parte caudale del nucleo (S2) (Sato et al., 1978). Nel coniglio

la marcatura retrograda ha mostrato che i motoneuroni innervanti lo sfintere anale vanno da S2 a S3 (Nagashima et al., 1979). Nell'uomo la posizione (Fig. 3k) e le caratteristiche morfometriche del nucleo di Onuf e dei suoi neuroni sono state studiate in dettaglio; il range di lunghezza del nucleo è di  $4\pm 7$  mm (Schroder, 1981; Pullen et al., 1997) anche se, studi di Forger et al. (1986) avevano dimostrato che il nucleo poteva essere leggermente più corto. Non vi sono differenze di lunghezza del nucleo tra il corno destro ed il corno sinistro (Schroder, 1981).

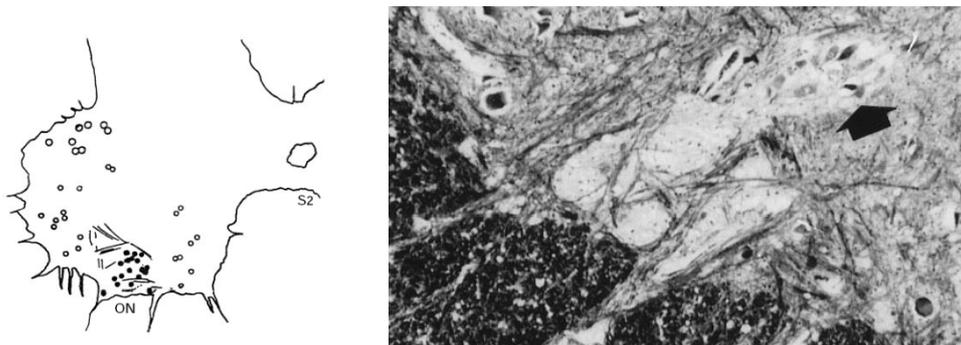


Fig. 3k. Lo schema a sinistra indica la precisa localizzazione del nucleo di Onuf nel corno anteriore (ventrale) del midollo spinale (S2) di uomo. La fotografia a destra mostra una sezione istologica dello stesso livello; la freccia indica un gruppo di neuroni del nucleo di Onuf. Modificato da Pullen et al. (1997).

I neuroni del nucleo di Onuf sono stati descritti, in studi riguardanti le loro dimensioni, come piccoli o medi (Onufrowicz, 1890; Mannen et al., 1977; Iwata e Hirano, 1978; Schroder, 1981). Pullen et al. (1992) hanno valutato il diametro dei motoneuroni del nucleo di Onuf nell'uomo in  $39\pm 13$   $\mu\text{m}$ . Pullen et al. (1997) hanno studiato il numero ( $625\pm 137$  cellule) e il diametro (tra 10  $\mu\text{m}$  e 60  $\mu\text{m}$ ) dei neuroni del nucleo di Onuf. La densità maggiore di neuroni è stata rilevata, come già risultava dagli studi dello stesso Onufrowicz (1889, 1890), nella zona centrale del nucleo rispetto all'estremità craniale e caudale dello stesso; dal punto di vista morfologico il 37% dei neuroni presentano una forma approssimativamente sferica, il 44% ellissoide ed il 19% fusiforme.

Nel nucleo di Onuf il dimorfismo sessuale è una caratteristica molto accentuata nel ratto (Breedlove & Arnold, 1981, 1983a,b) e nel cane (Forger & Breedlove, 1986), mentre nell'uomo non è stato ancora accertato. Si ritiene che le variazioni relative al dimorfismo sessuale siano dovute alle proiezioni efferenti del Nucleo di Onuf ed al comportamento

riproduttivo. Nel cane maschio il nucleo di Onuf si presenta 2,2 volte più grande e con un maggior numero di neuroni rispetto a quello della femmina (Forger & Breedlove, 1986). È stato dimostrato che questa differenza è legata al corredo ormonale dei soggetti; infatti un trattamento della femmina con androgeni permette di risparmiare quei neuroni del nucleo di Onuf che diversamente andrebbero incontro a morte.

## **Capitolo 4**

### **Innervazione della vescica**

#### **Sistema nervoso della vita di relazione**

##### **Nervo pudendo**

Il nervo pudendo innerva la muscolatura striata uretrale. Nel suino il nervo pudendo, che presenta un diametro di 1.5-2.2 mm ed è chirurgicamente raggiungibile (Wen et al., 1999), è costituito, similmente a quanto osservato nell'uomo, da fibre originatesi dai motoneuroni del nucleo di Onuf che costituiscono parte dei nervi sacrali S2-S4, e S5, quando presente (Wen et al., 1999). Il nervo pudendo innerva, inoltre, gli organi genitali interni ed esterni ed il retto, distribuendosi anche a vari muscoli della regione perineale.

#### **Sistema nervoso simpatico**

##### **Nervo ipogastrico**

Il nervo ipogastrico origina dal margine caudale del ganglio mesenterico caudale. I suoi rami si dirigono caudalmente verso la parete dorso-laterale della cavità pelvica dove, in sede retro-peritoneale, si suddividono nei loro rami terminali e, insieme ai nervi splanchnici sacrali della parte pelvica del cordone limitante ed ai rami pelvici parasimpatici dei primi nervi sacrali, prendono parte alla costituzione del plesso pelvico situato sulle pareti laterali del bacino e dell'ampolla rettale, in sede retro peritoneale. Gli assoni post-gangliari decorrono attraverso questo nervo ed attraverso il plesso pelvico raggiungono il corpo ed il collo della vescica e l'uretra; questi assoni post-gangliari simpatici che terminano sul muscolo liscio del corpo della vescica si concludono al livello di recettori adrenergici  $\beta$  e sono inibitori per la muscolatura liscia. La loro attivazione permette alla parete vescicale di espandersi ulteriormente, raccogliendo così un maggior quantitativo di urina.

Quando predomina l'attività del Sistema simpatico si ha l'accumulo dell'urina nella vescica (fase di accumulo).

## **Sistema nervoso parasimpatico**

### **Nervi pelvici**

Il nervo pelvico è costituito da fibre motrici destinate al detrusore e da fibre sensitive che forniscono informazioni relative allo stato di replezione della vescica. Questo nervo origina, nel maiale così come nell'uomo, dai segmenti S2-S3 del midollo spinale. Nel maiale presenta la peculiare caratteristica, non riscontrata in altre specie, di essere identificabile, prima della sua unione con il detrusore, come un singolo nervo lungo 2.5-4 cm (Wen et al., 1999). Nel nervo pelvico risiedono le fibre sensitive (propriocezione generale) che rispondono allo stiramento e/o alla pressione della parete vescicale. Alcune di queste fibre terminano nella colonna dorsale della sostanza grigia dei segmenti spinali sacrali; a tale livello prendono sinapsi con neuroni sensitivi secondari che inviano i loro neuriti nel cordone laterale per risalire percorrendo le vie spino-talamiche. Altre fibre sensitive non si arrestano nella colonna dorsale della sostanza grigia del midollo spinale, ma si portano direttamente nel cordone di sostanza bianca dorsale per raggiungere, nello spessore del fascicolo gracile, il nucleo gracile localizzato nel midollo allungato. Entrambe queste vie fanno riferimento al talamo per raggiungere in seguito la corteccia somestesica; mediante queste vie la sensazione vescicale raggiunge la percezione cosciente.

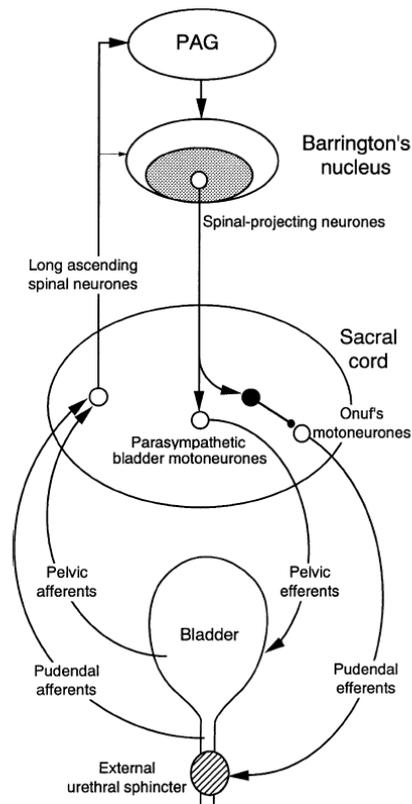


Fig. 4a. Rappresentazione schematica del circuito riflesso spino-bulbare della minzione.

Impulsi afferenti dalla vescica attivano neuroni ascendenti spinali. I neuroni ascendenti forniscono un forte impulso al grigio periacqueduttale (PAG, *periaqueductal gray*) ed un debole impulso al nucleo di Barrington. I neuroni del nucleo di Barrington eccitano i motoneuroni parasimpatici della vescica (nervo pelvico) e stimolano gli interneuroni inibitori localizzati nella commissura grigia dorsale nel midollo spinale sacrale; a turno inviano impulsi ai motoneuroni dello sfintere esterno nel nucleo di Onuf. Le afferenze uretrali del nervo pudendo, attivate dal flusso di urina attraverso l'uretra, rinforzano anche il circuito del riflesso centrale della minzione. Le frecce indicano sinapsi eccitatorie con connessioni mono o poli-sinaptiche; cerchietti bianchi: sinapsi inibitorie; cerchietti neri: neuroni a proiezione spinale. Non è indicato il circuito del riflesso spinale dell'accumulo tramite il nervo ipogastrico. Modificato da Sasaki (2004).

### Meccanismi di controllo della minzione e della continenza

La funzione delle basse vie urinarie è quella di accumulare ed eliminare urina secondo la volontà in tempi desiderati. Queste funzioni, in apparenza semplici, richiedono un controllo nervoso piuttosto complicato che coinvolge recettori localizzati nella parete vescicale, un circuito sopra spinale in grado di evocare il riflesso della minzione e diverse vie nervose inibitorie segmentarie e sopra spinali (Barrington, 1925; Kuru, 1965; de

Groat, 1975; Torrens & Morrison, 1987; Yoshimura & de Groat, 1997). Sfortunatamente la complessità di questi circuiti rende il sistema piuttosto vulnerabile, tanto che piccole lesioni e/o disfunzioni nervose possono provocare difetti quali incontinenza urinaria o difetti di svuotamento vescicale. La delicatezza di questi circuiti nervosi provoca, sia in ambito umano che veterinario, moltissimi problemi socio-sanitari.

## **Controllo nervoso delle basse vie urinarie**

### **Innervazione periferica delle basse vie urinarie**

Esistono tre classi di nervi periferici responsabili dello svuotamento della vescica: il sistema nervoso parasimpatico sacrale, il sistema nervoso simpatico toraco-lombare e i nervi somatici lombo-sacrali. Questi nervi contengono sia fibre efferenti che afferenti. Lo svuotamento vescicale è a carico del sistema nervoso parasimpatico e un disturbo di questo sistema può generare uno svuotamento incompleto o ritenzione urinaria. I motoneuroni pregangliari parasimpatici sono distribuiti alla base della sostanza grigia del corno ventrale nel midollo spinale sacrale. Nel gatto le fibre efferenti parasimpatiche originano da S1- S3 (Fig. 4b), nel ratto dai metameri L6- S1 e nell'uomo nei metameri S2-S4 (Jiang, 1999). Nel suino non è ancora nota la localizzazione precisa di tali neuroni parasimpatici pre-gangliari; per semplicità sono stati indicati nella figura 4c i metameri S3-S4 del midollo spinale.

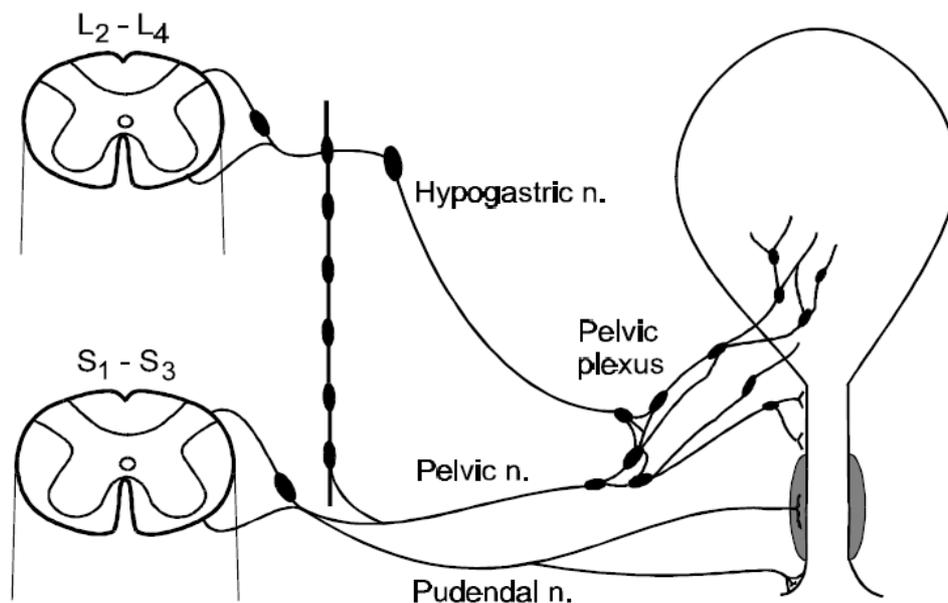


Fig. 4b. Diagramma schematico dell'innervazione estrinseca delle basse vie urinarie del gatto.

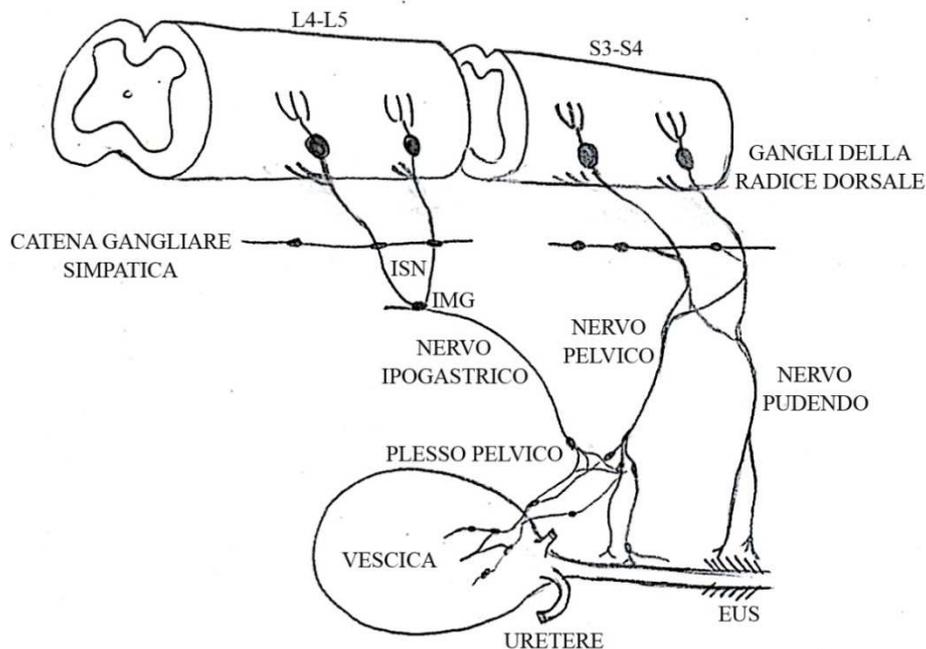


Fig.4c - Innervazione simpatica, parasimpatica e somatica del tratto urogenitale di verro. Le fibre pre-gangliari simpatiche emergono dal midollo spinale lombare, passano attraverso i gangli della catena simpatica vertebrale e da questi, tramite i nervi splancnici lombari (NSL), giungono al ganglio mesenterico caudale (CMG= caudal *mesenteric ganglion*). Le fibre simpatiche pre- e post-gangliari percorrono il nervo ipogastrico per raggiungere gli organi uro-genitali. Le fibre pre-gangliari parasimpatiche, che originano dai metameri sacrali, percorrono il nervo pelvico sino ad arrivare ai gangli del plesso pelvico. Da qui le fibre post-gangliari si distribuiscono alle vie urinarie inferiori. Le vie sacrali somatiche sono contenute all'interno del nervo pudendo, che innerva il pene, i muscoli ischio cavernoso, bulbocavernoso e il muscolo sfintere uretrale esterno (EUS= *external uretral sphincter*). I nervi pudendo e pelvico ricevono anche fibre post-gangliari simpatiche che originano nei gangli della catena vertebrale. Questi tre nervi contengono anche fibre afferenti provenienti dai gangli della radice dorsale lombo-sacrale. (Disegno personale modificato da De Groat & Yoshimura 2010).

Le fibre efferenti, appartenenti al gruppo delle fibre mieliniche più sottili (fibre A $\delta$ ), emergono dal plesso sacrale per formare il nervo pelvico. Questo nervo si divide in numerose sottili branche e forma il plesso pelvico, un insieme di fibre e neuroni localizzato su entrambi i lati del retto (de Groat, 1993). Queste fibre pregangliari si ramificano diverse volte prima di terminare su neuroni postgangliari. Nel cane, così come nell'uomo (Elbadawi, 1996), questi gangli sono distribuiti a ridosso della parete vescicale. I neuroni del plesso pelvico destinati alla vescica sono localizzati in prossimità del trigono vescicale. Le sottili fibre motrici postgangliari, amieliniche di tipo C, terminano nei fasci

di muscolatura liscia che costituiscono il muscolo detrusore della vescica. Questo vuol dire che la maggior parte delle fibre mieliniche trovate nella parete della vescica, specialmente le più grandi, sono afferenti (de Groat et al., 1980; Mallory et al., 1989; Vera & Nadelhaft, 1990).

Il plesso pelvico di ratto, se paragonato con quello del gatto e dell'uomo, possiede una struttura molto semplice, con modeste ramificazioni e interconnessioni. Il nervo pelvico forma un singolo tronco e converge con il nervo ipogastrico in un ganglio pelvico principale. Nel ratto non sono presenti altri gangli in prossimità della vescica o all'interno della sua parete (Purinton et al., 1973; Torrens & Morrison, 1987).

I nervi postgangliari parasimpatici liberano, come neurotrasmettitore, l'acetilcolina che, legandosi in maniera specifica ai recettori muscarinici distribuiti sulle cellule muscolari lisce, evoca contrazione muscolare (Yoshimura & de Groat, 1997). Come co-trasmettitore viene rilasciato ATP (adenosin-trifosfato) che agisce per il tramite dei recettori purinergici, provocando un aumento della contrazione muscolare in varie specie, inclusi il gatto ed il ratto (Fig. 4d). Questa componente non-colinergica, atropino-resistente, sembra invece ricoprire un ruolo secondario nella funzione fisiologica del detrusore nell'uomo e nei Primati (Craggs et al. 1986).

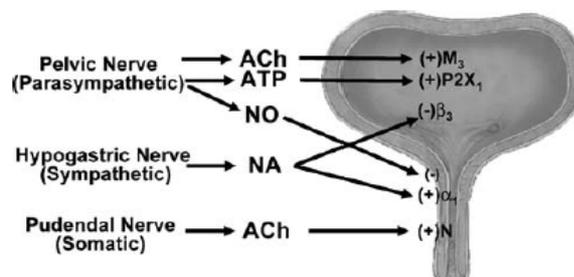


Fig. 4d. Innervazione delle basse vie urinarie. Il nervo pelvico (parasimpatico) stimola il muscolo detrusore della vescica, azione mediata da recettori muscarinici ( $M_3$ ) attivati dall'acetilcolina (ACh) e da recettori purinergici (P2X1) attivati dall'ATP, e rilassa il muscolo uretrale liscio con l'intervento dell'ossido nitrico (NO). Il nervo ipogastrico (simpatico) stimola il muscolo liscio uretrale, tramite recettori  $\alpha_1$ -adrenergici, ed inibisce il muscolo detrusore della vescica tramite recettori  $\beta_3$ -adrenergici. Il nervo pudendo (somatico) stimola il muscolo uretrale esterno striato tramite recettori nicotinici (N) ad attivazione acetilcolinica. N = Norepinefrina. I segni "+" e "-" indicano la stimolazione nervosa, eccitatoria ed inibitoria. Modificato da Yoshimura et al. (2008).

Il sistema parasimpatico può anche agire rilassando il detrusore mediante liberazione di ossido nitrico (Andersson & Persson, 1994).

Le funzioni più importanti del sistema nervoso simpatico consistono nell'inibire la contrazione vescicale, permettere la contrazione del collo della vescica e indurre la chiusura dell'uretra al fine di consentire la continenza urinaria. Il circuito pregangliare simpatico prende origine dai neuroni del nucleo intermedio laterale del midollo spinale toraco-lombare (Elbadawi, 1996). Le fibre pregangliari raggiungono il ganglio mesenterico caudale attraverso il nervo ipogastrico e attraverso la catena dei gangli simpatici sacrali (Kuo et al., 1984). Le fibre nervose simpatiche postgangliari, che rilasciano nor-adrenalina, esercitano un'azione inibitoria sulla muscolatura liscia del corpo della vescica agendo su recettori adrenergici (RA-)  $\beta_2$ ; nel collo della vescica e nell'uretra l'azione del sistema nervoso simpatico diviene invece eccitatoria grazie all'attivazione dei RA- $\alpha_1$  (de Groat, 1997). Nel ganglio pelvico di gatto è stata dimostrata un'azione inibitrice del sistema nervoso simpatico sulle efferenze post-gangliari (ganglio pelvico) del sistema nervoso parasimpatico (de Groat & Booth, 1980; Mallory et al., 1989); questo stimolo è mediato dai RA- $\alpha_2$  (de Groat, 1997).

I nervi somatici lombo-sacrali innervano la muscolatura striata del pavimento pelvico. Questo circuito ha origine da specifici motoneuroni del nucleo di Onuf (Sato et al., 1978; Torrens & Morrison, 1987). Questo nucleo si trova all'incirca allo stesso livello dei metameri dei neuroni pregangliari parasimpatici della vescica (S3-S4 nel suino, S1-S3 nel gatto, L6- S1 nel ratto, S2- S4 nell'uomo). Dal nucleo di Onuf originano fibre che viaggiano nel nervo pudendo; questo contingente raggiunge lo sfintere uretrale, costituito da muscolatura striata. L'innervazione della muscolatura del pavimento pelvico riceve invece un contributo anche da altri nervi del plesso sacrale (de Groat, 1997). Le fibre nervose del sistema somatico liberano acetilcolina, che agisce sui recettori nicotinici dello sfintere striato uretrale provocandone la contrazione (Yoshimura & de Groat, 1997). L'attivazione coordinata del sistema nervoso simpatico (su vescica e uretra) e somatico (sull'uretra) determina continenza urinaria.

### **Recettori vescicali e sensibilità vescicale**

Le fibre dei nervi afferenti provenienti dalla vescica sono sottili, mieliniche (A $\delta$ ) e amieliniche (C), e viaggiano sia nel nervo pelvico (via parasimpatica) che nel nervo ipogastrico che proviene dal ganglio mesenterico caudale (sistema nervoso simpatico); queste fibre sono associate a meccanocettori, termocettori, nocicettori e anche a specifici chemiocettori (Torrens e Morrison, 1987; Häbler et al., 1993a,b; Morrison, 1997). Tuttavia l'esatta morfologia e la topografia degli specifici recettori è ancora da determinare. I meccanocettori della vescica informano i centri nervosi sullo stato di replezione della vescica e attivano e guidano il riflesso della minzione; molti di questi sono tensiocettori localizzati in serie insieme ai fasci di cellule muscolari lisce del muscolo detrusore e rispondono sia alla distensione passiva della vescica che alla contrazione attiva del detrusore (Iggo, 1955; Bahns et al., 1987; Häbler et al., 1993a,b; Downie & Armour, 1992). Tali risultati sono sommariamente descritti dalla legge di Laplace (Jiang, 1999), che indica che ci sono molti più stimoli sensitivi al variare della pressione della vescica che al variare del suo volume. Questo è un dato importante perché, durante l'accumulo fisiologico di urina, il detrusore si può dilatare senza scatenare il riflesso della minzione; solo al raggiungere di un certo grado di replezione si ha anche un aumento della pressione di sufficiente ad evocare il riflesso della minzione. Possiamo dire quindi che la tensione della parete vescicale e l'attività dei meccanocettori aumentano molto lentamente. I meccanocettori della vescica possono essere sensibilizzati da agenti infiammatori (Häbler et al., 1993a,b), il che giustifica il carattere d'urgenza dei sintomi della cistite. In situazioni simili, cioè in corso di infiammazione, vengono reclutate fibre C, normalmente silenti, di recettori dolorifici (Wen & Morrison, 1995); un sottogruppo di questi nocicettori sembra essere rappresentato da meccanocettori ad alta soglia che rispondono alla sovradistensione della vescica (Morrison, 1997).

### **Controllo centrale della minzione**

L'effettivo svuotamento della vescica richiede una buona coordinazione tra il muscolo detrusore e lo sfintere uretrale e perciò una buona coordinazione anche tra sistema nervoso autonomo e somatico. A differenza di altre funzioni viscerali, la minzione è un atto volontario che richiede il coinvolgimento dei centri cerebrali superiori. Barrington (1925), eseguendo i suoi primi esperimenti sul gatto, notò che neuroni localizzati nel

ponte, ventralmente al collicolo caudale, avevano un ruolo fondamentale nel controllo della minzione. Un'interruzione delle vie discendenti al livello del tronco encefalico o del midollo spinale caudali a questa area pontina (il PMC) impedisce il normale svuotamento della vescica; al contrario, lesioni rostrali al collicolo caudale provocano uno svuotamento vescicale dovuto alla mancanza di stimoli inibitori sul centro dell'accumulo, localizzato, come precedentemente descritto, lateralmente al PMC.

Queste osservazioni indicano che la minzione è mediata da un circuito di riflessi che risalgono il midollo spinale, oltrepassano il midollo allungato e vengono integrati al livello di PMC. Il circuito agisce come un interruttore *on-off* e viene attivato dai meccanocettori vescicali. La funzione del centro pontino è, a sua volta, quella di regolare gli stimoli inibitori ed eccitatori provenienti dalle diverse aree encefaliche rostrali al PMC, come, ad esempio, il diencefalo e la corteccia cerebrale (Gjone & Setekleiv, 1963; Gjone, 1966; Torrens & Morrison, 1987; de Groat, 1997). Le informazioni sul grado di riempimento della vescica raggiungono il PMC attraverso fibre ascendenti spinolbulbari che corrono nella parte dorsale del funicolo laterale. Le cellule di origine sembrano essere localizzate in prossimità del nucleo parasimpatico sacrale e del nucleo commissurale dorsale.

È stato dimostrato che nel gatto l'informazione propriocettiva, che raggiunge le lamine I, V, VII e X del midollo spinale, viaggia nel nervo pelvico e pudendo e raggiunge i centri superiori percorrendo aree laterali del cordone dorsale della sostanza bianca midollare. Gli stimoli dolorifici, condotti da fibre amieliniche di tipo C del nervo ipogastrico e pelvico, risalgono il midollo spinale percorrendo fasci localizzati nel cordone laterale della sostanza bianca midollare (de Groat, 2006). L'organizzazione del circuito a livello di tronco encefalico non è ancora chiara: secondo Holstege e Collaboratori (Blok & Holstege, 1994, 1998; Blok et al., 1995), nel gatto le informazioni provenienti dal midollo spinale raggiungono indirettamente il PAG; nel ratto sembra che le afferenze raggiungano il PAG direttamente (Ding et al., 1997).

Le fibre discendenti originatesi dai neuroni del PMC corrono lungo il funicolo laterale del midollo spinale per terminare direttamente su neuroni parasimpatici pregangliari sacrali o su interneuroni (Blok & Holstege, 1997). Le stesse fibre terminano anche su interneuroni inibitori, posti dorsalmente al canale centrale, che proiettano al nucleo di Onuf (Blok et al., 1997a); si può ritenere che questa proiezione sia responsabile del

rilassamento dello sfintere. Le fibre discendenti raggiungono anche i neuroni pregangliari simpatici inibendoli. Da tutto questo si evince come il riflesso della minzione coinvolga circuiti nervosi parasimpatici, simpatici e somatici.

I neuroni ascendenti e discendenti sono neuroni eccitatori glutamatergici (Yoshimura & de Groat, 1997). Lindstrom e collaboratori (1984) hanno ipotizzato che il riflesso della minzione sia organizzato da meccanismi a feedback positivo. Un riflesso di contrazione del detrusore genera un aumento della tensione nella parete vescicale che porta a un'ulteriore attivazione dei meccanocettori della vescica e ad un più potente stimolo eccitatorio inviato dal PMC. Questo processo ha una rapida crescita e provoca la massima risposta dei neuroni che inviano il proprio neurite nel nervo pelvico (parasimpatico, svuotamento); inoltre questo stimolo è incrementato dal contatto dell'urina con i recettori uretrali (Barrington, 1928). Quando la vescica è vuota la pressione esercitata sui suoi recettori decresce e perciò si esaurisce il riflesso della minzione.

### **Controllo nervoso della continenza**

Un accumulo efficace di urina richiede una certa capacità dilatativa del detrusore e un condotto uretrale in grado di contenere l'urina. Qualunque stimolo che provochi una piccola salva di impulsi provenienti dai meccanocettori, ad esempio un colpo di tosse, uno stiramento o un balzo, può scatenare il riflesso della minzione e portare inevitabilmente alla perdita di urina. Fortunatamente, il sistema di controllo nervoso della vescica è dotato di circuiti di sicurezza, sia a livello spinale che sovraspinale, che possono mantenere inattivi i motoneuroni parasimpatici della vescica e chiusa l'uretra (Sugaya et al., 2005). Un tipico esempio è il riflesso di Edvardsen (Edvardsen, 1968), attivo durante il riempimento vescicale; tale riflesso coinvolge i circuiti simpatici che inibiscono il detrusore e provocano la contrazione della componente muscolare liscia dell'uretra, il cosiddetto sfintere interno dell'uretra, che nel cane non sembra esistere. Questo riflesso è attivo solamente durante la fase di riempimento della vescica ed è inibito durante lo svuotamento (de Groat & Lalley, 1972). Allo stesso modo, durante il riempimento della vescica, i motoneuroni dello sfintere esterno uretrale e del pavimento pelvico sono attivati dai meccanocettori vescicali; l'uretra rimane chiusa durante l'intera fase di riempimento. Come già detto, durante la minzione, questo riflesso è inibito anche da segnali discendenti pontospinali (Torrens & Morrison, 1987).

Altri segnali inibitori vescicali sono veicolati da fibre afferenti presenti nella branca anorettale del nervo pelvico (parasimpatico) e nelle branche clitoridee, peniene e muscolari nel nervo pudendo (de Groat, 1971; Lindström & Sudsuang, 1989). Queste afferenze, che attivano i neuroni inibitori simpatici e inibiscono attraverso un'inibizione centrale i neuroni pregangliari parasimpatici sacrali (Fall & Lindström, 1991), inibiscono il riflesso della minzione durante l'accoppiamento. I segnali inibitori influenzano anche i neuroni spinali che inviano le fibre ai centri superiori e che rappresentano il "braccio" afferente del riflesso della minzione (Jiang et al. 1991); durante l'accumulo di urina si ha ovviamente anche un'attivazione delle vie nervose che portano alla chiusura dello sfintere striato esterno (nervo pudendo).

Sono stati descritti effetti inibitori sulla minzione dopo stimolazione elettrica di molti siti sovraspinali della corteccia cerebrale, dell'ipotalamo, dei gangli basali e della neocorteccia (Gjone & Setekleiv, 1963, Gjone, 1966, Kuru, 1965); ciononostante, l'organizzazione di questi sistemi di controllo non è ancora ben chiarita. È comunque ipotizzabile che un ridotto funzionamento di questi sistemi inibitori sovraspinali possa portare ad uno squilibrio tra i controlli eccitatorio ed inibitorio del riflesso della minzione. Problemi di questo tipo possono provocare varie forme di instabilità vescicale e urgenti problemi di incontinenza urinaria (Lindström et al., 1984; Fall & Lindström, 1991; de Groat, 1997).

### **Innervazione intrinseca della vescica**

I primi studi sull'innervazione intrinseca della vescica risalgono ai primi decenni del ventesimo secolo e riguardano la vescica di gatto (Mosely, 1936; Kuntz & Mosely, 1936). In seguito, dalla seconda metà del secolo scorso ad oggi, sono state pubblicate interessanti ricerche inerenti ad altre specie di Mammiferi [maiale (Crowe & Burnstock, 1989; Pidsuko, 2004; osservazioni personali, Fig. 4e), cane (Arrighi et al., 2008); gatto (Hamberger & Norberg, 1965; Fehèr et al., 1979), ratto (Langworthy, 1965; Lakomy et al., 1989, 1990; Persson et al., 1995; Alian & Gabella, 1996; Uvelius & Gabella, 1998; Gabella, 1999), cavia (Crowe et al., 1986; Gabella 1990; Smet et al., 1996; Werkström et al., 1998; Hu et al., 2004; Davidson & McCloskey, 2005; Gillespie et al., 2006), furetto (Gabella, 1990), cavallo (Prieto et al., 1989), uomo (Gilpin et al., 1983; Dixon et al., 1983),], che sono riuscite ad ottenere dati relativamente precisi e dettagliati riguardanti la

morfologia, la morfometria, la distribuzione, la densità e la neurochimica della componente nervosa intramurale. Ulteriori importanti dati sono stati ottenuti in merito alla localizzazione di questi neuroni nelle diverse aree della vescica in relazione alle varie specie. Le continue, anche se non numerose, acquisizioni scientifiche hanno permesso di formulare interessanti ipotesi funzionali, sebbene a tutt'oggi non sia ancora chiaro il ruolo di questi neuroni. Ad esempio, ai neuroni riscontrati nella parete vescicale è stato attribuito un potenziale ruolo, eccitatorio o inibitorio, nel controllo del muscolo detrusore, degli osti ureterici e della componente muscolare liscia che costituisce, a seconda della specie, il cosiddetto sfintere uretrale interno (gatto, Fehèr et al., 1979; uomo, Gilpin et al., 1983; cavia, Hu et al., 2004). Altre funzioni espletate dai neuroni vescicali potrebbero essere quelle di regolare il flusso sanguigno e linfatico e di fungere da modulatori/integratori dei segnali nervosi estrinseci.

Un altro aspetto da considerare in merito alle funzioni dei neuroni intravescicali riguarda una loro ipotetica funzione come meccanocettori; è stato infatti dimostrato che durante i movimenti muscolari gli stessi neuroni subiscono delle modificazioni che possono essere percepite come stimoli meccanici; queste sono speculazioni che derivano dallo studio del sistema nervoso enterico, ipotizzate già nel 1981 da Gabella e riprese di recente dall'equipe del Prof. Michael Schemann in Germania (Mazzuoli et al., 2007).

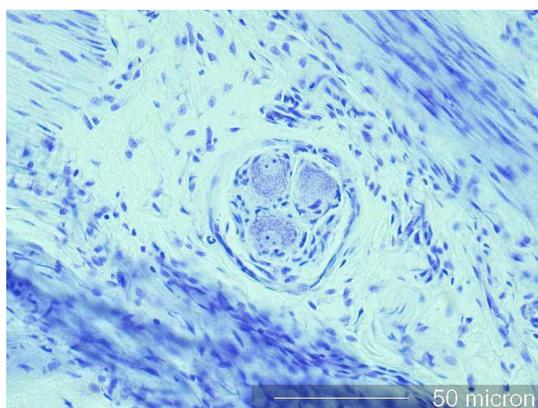


Fig. 4e. Sezione istologica di vescica di maiale colorata con la tecnica del cresilvioletto. È evidente un piccolo ganglio intramurale situato nello spessore della muscolatura liscia costituito da tre neuroni.

Il sistema nervoso vescicale intramurale è costituito da popolazioni cellulari di numero variabile nelle diverse specie; Pidsuko (2004), confermando in parte i risultati ottenuti sulla stessa specie da Crowe & Burnstock (1989), ha osservato più di 6000 neuroni

vescicali nel maiale, distribuiti per l'80% in gangli in posizione sub-peritoneale o localizzati nello strato muscolare esterno del trigono vescicale. La rimanente parte (20%) dei neuroni, organizzati in piccoli gangli di qualche decina di cellule, era distribuita nella parete ventrale della vescica. Pidsuko et al. (2004) hanno identificato questi neuroni iniettando un tracciante fluorescente a trasporto retrogrado, il Fast Blue, nelle pareti vescicali laterali al trigono. Considerata la sede di iniezione si può evincere che nel maiale gran parte dei neuroni vescicali proietta a strutture intravesicali.

Gli elementi del sistema nervoso centrale e autonomo possono subire delle modificazioni durante l'invecchiamento. Il sistema nervoso intravesicale non sembra sfuggire a questa regola. Negli animali, così come nell'uomo, l'età della senescenza porta inevitabilmente a dei disturbi legati alla continenza urinaria.

È noto che il riempimento vescicale è modulato dalle fibre adrenergiche che agiscono su  $\beta$ -adrenorecettori presenti sulle cellule muscolari lisce del detrusore (Andersson and Wein, 2004). Esistono differenti sottotipi di  $\beta$ -recettori adrenergici:  $\beta$ -1,  $\beta$ -2 e  $\beta$ -3, diversamente distribuiti e dotati di peculiari funzioni a seconda della specie considerata (Michel and Vrydag, 2006). Considerando il ruolo antitetico dei neuroni colinergici (eccitatori) e nitrergici (inibitori) si può ipotizzare che nell'anziano l'incontinenza urinaria sia attribuibile ad uno squilibrio tra gli effetti reciproci delle due popolazioni neuronali, conseguenza di una sempre più deficitaria popolazione colinergica (Yoshida et al., 2001).

# Parte sperimentale

Questa ricerca si è sviluppata in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università di Parma. Lo studio, che si è svolto in più fasi, ha avuto lo scopo di studiare l'innervazione afferente ed efferente del trigono vescicale e del muscolo uretrale del maiale.

Fase 1 ) Nella prima fase sono state applicate delle reazioni di immunistochemica con il fine di caratterizzare, dal punto di vista neurochimico, i neuroni dei gangli spinali lombo-sacrali di maiale; nello specifico sono stati usati sei diversi anticorpi diretti contro i seguenti marcatori neuronali: il peptide correlato al gene della calcitonina (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP), la sostanza P (*substance P*, SP), l'ossido nitrico sintasi neuronale (*neuronal nitric oxide synthase*, nNOS), il neurofilamento ad alto peso molecolare (*neurofilament 200kDa*, NF200), il recettore per la capsaicina VR1 (*vanilloid receptor 1*), detto anche TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*), e l'isolectina B4 (IB4), glicoproteina derivata dalla pianta *Griffonia simplicifolia*.

Fase 2) Nella seconda fase è stata coniugata la tecnica dei traccianti neuronali a trasporto assonico retrogrado e le tecniche di immunistochemica che hanno permesso di identificare e caratterizzare i neuroni dei gangli spinali deputati all'innervazione sensitiva del trigono vescicale. Nello specifico è stato usato il tracciante Fast Blue (FB) che è stato iniettato direttamente nello spessore della parete del trigono vescicale di 4 maiali (maschi). I neuroni dei gangli spinali destinati all'innervazione del trigono vescicale marcati con il tracciante citoplasmatico FB, sono stati in seguito analizzati dal punto di vista morfometrico e neurochimico. I risultati delle ricerche eseguite nelle fasi 1 e 2 hanno portato alla pubblicazione dei seguenti articoli: Russo et al. 2013.

Fase 3) Contemporaneamente, sempre utilizzando lo stesso tracciante, è stato possibile identificare i motoneuroni gangliari del sistema nervoso autonomo (simpatico e parasimpatico); sui neuroni della componente simpatica sono stati eseguiti studi di morfometria e di caratterizzazione neurochimica utilizzando anticorpi in grado di riconoscere i seguenti *markers* neuronali: la tirosina idrossilasi (*tyrosine hydroxylase*, TH) e la dopamina beta-idrossilasi (*dopamine beta-hydroxylase*, DBH) che sono i tipici enzimi utilizzati dai neuroni del sistema nervoso simpatico per la sintesi dei neurotrasmettitori dopamina e nor-adrenalina, il neuropeptide Y (NPY), il CGRP, la SP, il peptide vasoattivo intestinale (*vasoactive intestinal polypeptide*, VIP), il nNOS, il trasportatore delle vescicole di acetilcolina (*vesicular acetylcholine transporte*, VAcHT), la leucoencefalina (*leuencephalin*, LENK) e la somatostatina (*somastatin*, SOM). I risultati delle ricerche eseguite nella fase 3 hanno portato alla pubblicazione dei seguenti articoli: Ragionieri et al. 2013.

Fase 4) L'ultima fase, ancora in corso, è dedicata all'identificazione dei neuroni motori (somatomotori) e sensitivi destinati all'innervazione del muscolo uretrale, di natura striata. Anche in questo caso sono state applicate le metodiche descritte in precedenza; gli anticorpi utilizzati sono, in questo caso, diretti contro i marcatori nNOS, SP e VR1. I risultati delle ricerche eseguite nella fase-3 hanno portato alla pubblicazione dei seguenti articoli: Gazza et al. 2011.

# Fase 1-2

## **Caratteristiche neurochimiche dei neuroni dei gangli spinali lombosacrali di maiale e caratterizzazione dei neuroni sensitivi che innervano il trigono vescicale.**

Russo D, Clavenzani P, Sorteni C, Bo Minelli L, Botti M, Gazza F, Panu R, Ragionieri L, Chiocchetti R.

**Neurochemical features of boar lumbosacral dorsal root ganglion neurons and characterization of sensory neurons innervating the urinary bladder trigone.**

J Comp Neurol. 2013 Feb 1; 521(2):342-66.

### **Riassunto**

In questa ricerca sono stati caratterizzati neurochimicamente i neuroni dei gangli spinali (DRG, dorsal root ganglia) lombo-sacrali di maiale di sesso maschile; a tal fine sono stati utilizzati sei marcatori neuronali: il peptide correlato al gene della calcitonina (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP), la sostanza P (*substance P*, SP), l'ossido nitrico sintasi neuronale (*neuronal nitric oxide synthase*, nNOS), il neurofilamento ad alto peso molecolare (*neurofilament 200kDa*, NF200), il recettore per la capsaicina VR1 (*vanilloid receptor 1*), detto anche TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*), e l'isolectina B4 (IB4), glicoproteina derivata dalla pianta *Griffonia simplicifolia*.

Inoltre, il fenotipo e l'area dei neuroni dei DRG destinati al trigono della vescica urinaria (UBT, *urinary bladder trigone*) sono stati valutati accoppiando la tecnica della iniezione di un tracciante a trasporto retrogrado con tecniche di immunostochimica. Le sottopopolazioni neuronali dei gangli spinali lombari e sacrali sono risultate immunoreattive (IR) al CGRP (30±3% e 29±3%, rispettivamente), alla SP (26±8% e 27±12%, rispettivamente), al nNOS (21±4% e 26±7%, rispettivamente), al NF200

(75±14% e 81±7%, rispettivamente), al TRPV1 (48±13% e 43±6%, rispettivamente) e marcate con IB4 (56±6% e 43±10%, rispettivamente). I neuroni sensitivi dell'UBT, osservati nei gangli compresi tra il secondo ganglio lombare (L2) e il primo ganglio coccigeo (Ca1), hanno mostrato una distribuzione segmentale e la maggiore densità nei gangli L4-L5 e S2-S4. I neuroni sensitivi lombari e sacrali destinati al trigono vescicale hanno espresso simili percentuali di immunoreattività per il NF200 (64±33% e 58±12%, rispettivamente) mentre hanno espresso significative differenze per quanto riguarda le molecole CGRP, SP, nNOS e TRPV1 (56±9%, 39±15%, 17±13%, 62±10%, vs. 16±6%, 16±11%, 6±1%, 45±24%, rispettivamente). I neuroni sensitivi lombari e sacrali hanno inoltre mostrato una differente marcatura per l'IB4 (67±19% e 48±16%, rispettivamente). Presi insieme, questi dati indicano che le fibre sensitive che viaggiano lungo i nervi lombari e sacrali giocano probabilmente ruoli diversi nella trasmissione sensitiva trigonale. Anche i dati relativi alle dimensioni (area) dei neuroni sensitivi destinati al trigono hanno rinforzato questa ipotesi, poiché i neuroni lombari erano significativamente più grandi di quelli sacrali ( $1,112 \pm 624 \mu\text{m}^2$  vs.  $716 \pm 421 \mu\text{m}^2$ ).

## **Introduzione**

La vescica urinaria (UB, *urinary bladder*) ha due funzioni principali: lo stoccaggio dell'urina e la sua periodica e volontaria espulsione. Circuiti neuronali interconnessi sono coinvolti nel controllo della continenza e della minzione:

1. Il tronco cerebrale, che integra le informazioni sensitive della vescica e gli *input* emozionali a livello della materia grigia periacqueduttale del mesencefalo e il centro pontino della minzione (nucleo di Barrington) (Holstege, 2005; Birder et al., 2010; Drake et al., 2010). Le vie discendenti controllano l'attività dei neuroni autonomi pre-gangliari e dei neuroni del nucleo di Onuf, che, attraverso il nervo pudendo attivano lo sfintere uretrale esterno striato (Fowler et al., 2008).
2. Il sistema nervoso parasimpatico, che promuove la minzione attraverso l'attivazione del nervo pelvico, stimolando la contrazione del muscolo detrusore e il rilassamento dello sfintere uretrale interno liscio.
3. Il sistema nervoso simpatico, che determina il rilassamento del detrusore e la contrazione del muscolo sfintere uretrale interno liscio.

Inoltre, il sistema nervoso intramurale della vescica potrebbe giocare un ruolo funzionale importante almeno in quelle specie in cui presenta ampia distribuzione, come ad esempio nell'uomo (Gilpin et al., 1983), maiale (Lakomy et al., 1990; Pidsudko, 2004; osservazione personale Chiocchetti), gatto (Feher et al., 1979) e cavia (Crowe et al., 1986; Gabella, 1990).

Le fibre nervose afferenti presentano un'ampia distribuzione nello spessore della vescica, essendo stati identificate fibre sensitive a ridosso (Andersson, 2002) e all'interno dell'urotelio (Gabella e Davis, 1998; Birder e de Groat, 2007; Radziszewski et al., 2009), intorno ai vasi sanguigni (Smet et al., 1997) e ai neuroni intramurali (Gillespie et al., 2006). Sebbene i dettagli sui meccanismi sensitivi vescicali siano ancora scarsi, nuove informazioni emergono di continuo al fine di comprendere il meccanismo sensitivo coinvolto nella fisiologia e patologia della vescica (Applebaum et al., 1980; Keast e de Groat, 1992; Fowler et al., 2008; de Groat e Yoshimura, 2009; Wyndaele, 2010; Arms e Vizzard, 2011). È noto che l'informazione sensitiva estrinseca trasporta informazione nocicettiva (A $\beta$ -, A $\delta$ -, C-fibre) e non-nocicettiva (A $\alpha$ / $\beta$ -, e A $\delta$ -fibre) lungo le tre divisioni sopra menzionate del sistema nervoso (Djoughri e Lawson, 2004). In specie come il ratto, il topo, il gatto, l'uomo e il maiale, i neuroni sensitivi dell'UB sono distribuiti segmentalmente lungo i gangli spinali; secondo la letteratura disponibile, i neuroni sensitivi dell'UB del ratto e del topo sono principalmente localizzati nei gangli T11-T13, L1-L3 e L5-S1 (Applebaum et al., 1980; Nadelhaft e Both, 1984; Keast e de Groat, 1992; Bennett et al., 1996; Yoshimura et al., 1996; Callsen-Cencic e Mense, 1997; Nandigama et al., 2010); i neuroni sensitivi del gatto sono localizzati nei gangli L2-L7 e S1-S3 (Applebaum et al., 1980; Downie et al., 1984). Nell'uomo i neuroni sensitivi sono distribuiti nei gangli T11-L2 e S2-S4 (de Groat e Yoshimura, 2009) mentre nella maiale (studio riferito alla parte laterale destra della vescica), i neuroni sono localizzati nei gangli L3-L6, S3-S4 e Ca1 (Bossowska et al., 2009).

Tutti questi studi sono stati eseguiti iniettando traccianti a trasporto retrogrado nella vescica e sono stati progettati per identificare la maggior parte dei neuroni afferenti. Nel presente studio consideriamo in particolar modo l'area trigonale (*trigonum vesicae*), area dorsale triangolare delimitata dagli orifizi ureterico e uretrale e ricoperta da un epitelio classicamente considerato di origine mesodermica (McGaedy et al., 2006) ma la cui origine endodermica è stata suggerita di recente (Tanaka et al., 2010). Il trigono

urinario vescicale mostra aspetti particolari; infatti esso è il sito nel quale la maggior parte dei vasi e delle fibre nervose penetrano nell'UB (Fowler et al., 2008; Birder et al., 2010) e dove le fibre neuronali e i neuroni intramurali sono più concentrati (Andersson, 2002; Pidsudko, 2004). È stato mostrato che il collo della vescica ha più fibre sensitive di altre regioni dell'UB nel gatto (Uemura et al., 1975), nel ratto (Gabella e Davis, 1998) e anche nel maiale (Larsen et al., 1978; Lakomy et al., 1990). Uemura et al. (1973, 1975) hanno dimostrato che la UBT del gatto contiene un numero eccezionalmente alto di terminali sensitivi che hanno origine nei nervi lombari splancnici e ipogastrico (principalmente distribuiti nella sottomucosa) e nei nervi pelvici (principalmente distribuiti nel detrusore). Le fibre sensitive distribuite nella sierosa di topo sembrano originare dai nervi splancnici (Xu e Gebhart, 2008).

L'UBT rappresenta un sito elettivo per la proliferazione del cancro tanto in medicina veterinaria (Wilson et al., 2007; Saulnier-Troff et al., 2008) quanto in medicina umana (Shokeir, 2004). Durante gli interventi di rimozione del cancro vescicale o prostatico, l'area trigonale, densamente innervata, subisce un'ampia dissezione anatomica che può danneggiare o distruggere l'innervazione afferente ed efferente del trigono (e dell'uretra). Questa situazione non solo può alterare la sensazione uretrale negli uomini (John et al., 2001) ma è anche alla base di disfunzioni neurologiche come l'incontinenza. È necessaria grande cura durante la rimozione chirurgica dei tessuti poiché una parziale innervazione e, conseguentemente, la continenza urinaria può essere ristabilita pochi mesi dopo la chirurgia se l'integrità dell'innervazione trigonale è preservata (John et al., 2001).

La neoplasia vescicale non è frequente nel maiale; comunque, i casi più frequentemente registrati coinvolgono animali giovani (Nieberle e Cohors, 1967; Nielsen e Moulton, 1990). Il cancro o altre condizioni patologiche localizzate o invasive che affliggono il trigono, come l'infiammazione (cistite), innescano sensazioni di dolore eccitando i recettori delle fibre C e A- $\delta$  (Häbler et al., 1990), che possono agire come vie nocicettive e/o meccanocettive (Wyndaele, 2010).

La conoscenza dei circuiti delle fibre sensitive destinate alla vescica urinaria è fondamentale per la chirurgia sperimentale e terapeutica; in particolare, nel caso di lesione del midollo spinale, la vescica e il muscolo uretrale esterno si contraggono simultaneamente (dissinergia dello sfintere detrusore) (Kutzenberger et al., 2005).

Il maiale inoltre, contrariamente agli animali più piccoli come ratti e gatti, ha il vantaggio di presentare conformazione anatomica, dimensioni e funzionalità del sistema urinario simili a quello dell'uomo (Wen et al., 1999; Dalmoose et al., 2000) e rappresenta quindi un modello sperimentale animale estremamente adatto.

## **Materiali e metodi**

Tutte le procedure descritte oltre sono state eseguite in accordo con la direttiva dell'*European Communities Council* del 24 novembre 1986 (86/609/EEC) e la legislazione italiana riguardante gli animali da sperimentazione dopo approvazione da parte del comitato etico scientifico per la sperimentazione sugli animali dell'università di Parma (Prot. Rif. 68/09). Sono stati compiuti tutti i tentativi possibili per ridurre al minimo il numero degli animali utilizzati e la loro sofferenza.

Cinque maiali maschi interi ottenuti dall'incrocio delle razze *Large white x Landrace x Duroc* (peso medio:  $34\pm 3$  Kg, intervallo 30-38 Kg) sono stati alimentati con una dieta ad libitum per una settimana prima dell'esperimento. Gli animali sono stati sottoposti a digiuno per 24 ore prima dell'intervento chirurgico. La profilassi antibiotica pre-operatoria è stata eseguita con ceftiofur sodium (Naxcel, 5 mg/Kg i.m., Pfizer, Sandwich Kent, UK). Gli animali sono stati sedati con azaperone (4-10 mg/10Kg; Stresnil, Janssen Cilag, Cologno Monzese, Italy) e ketamina (150 mg/10Kg; Ketavet 100, Intervet Italia, Aprilia, Italy) somministrati per via intramuscolare. Dopo il decubito e la cateterizzazione venosa (*vena auricularis lateralis*) l'anestesia è stata indotta attraverso la somministrazione di propofol (2-6 mg/Kg i.v.; Rapinovel, Schering Plough, Segrate, Italy) e mantenuta con isofluorano 1,5-2% in 100% di ossigeno distribuito da un circuito aperto attraverso un tubo orotracheale cuffiato Magill. La profilassi post-operatoria è stata eseguita per 5 giorni dopo l'intervento, con tolfedine (2 mg/Kg; Vetoquinol, Magny-Vernois, Lure Cedex, France) per l'effetto anti-infiammatorio e buprenorphine (10 mg/kg i.m.; Temgesicl, Schering Plough, Segrate, Italy) per garantire l'analgesia.

I maiali sono stati posizionati sul tavolo operatorio in decubito dorsale, la pulizia del campo operatorio è stata eseguita utilizzando betadine e alcool isopropilico. L'intervento di laparotomia è stato effettuato con una incisione post-ombelicale sulla linea alba lunga 10-12 cm. Una volta esposta la superficie dorsale della vescica, sono stati iniettati, per mezzo di una micro-siringa in vetro Hamilton da 10 µl, 50 µl di tracciante

fluorescente a trasporto retrogrado Fast Blue (FB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany; soluzione acquosa al 2%) in 5 siti del trigono vescicale. Le iniezioni sono state eseguite al centro dell'area trigonale e vicino alla giunzione di ciascun uretere con la vescica; i siti di iniezione erano facilmente individuabili per la presenza del colore giallo lasciato dal deposito del tracciante al di sotto della sierosa. Una esecuzione attenta e scrupolosa di questa fase della procedura è importante per evitare qualunque fuoriuscita del tracciante dai siti di iniezione. Dopo aver riposizionato correttamente i visceri in addome, questo è stato chiuso con una sutura di routine a tre strati. Il ricovero e il periodo post-operatorio sono stati privi di eventi significativi. Due settimane dopo la chirurgia, i maiali sono stati profondamente sedati ed anestetizzati e sottoposti ad eutanasia per somministrazione intravenosa di embutramide, mebenzonium iodide e tetracaine idrocloride (Tanax, Intervet, Italy; 0,3 ml/Kg).

### **Preparazione del tessuto**

Immediatamente dopo la soppressione dell'animale è stata eseguita una laminectomia al fine di esporre e prelevare il midollo spinale da T11 a Ca2. Questa procedura è stata eseguita con particolare attenzione per evitare di tagliare le radici spinali che assicurano il riconoscimento dei diversi segmenti del midollo spinale e dei DRG così da consentire il loro riconoscimento durante il campionamento. Un altro importante punto di reperi utilizzato è stato il riconoscimento dell'ultimo nervo spinale toracico localizzato caudalmente alla XIV costa.

Midollo e gangli sono stati fissati per 12 ore in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato (0,1M, pH 7,2) a 4°C. I tessuti sono stati in seguito risciacquati *overnight* in PBS (0,15M NaCl in 0,01M di tampone sodio fosfato, pH 7,2) e stoccati a 4°C in PBS contenente saccarosio (30%) e sodio azide (0,1%). Il giorno seguente i campioni sono stati trasferiti in una soluzione di PBS-Saccarosio-Azide e *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (Sakura Finetek Europe, Alphen an den Rijn, The Netherlands) in rapporto 1:1 per altre 24 ore prima di essere immersi in OCT al 100% in vaschette di plastica per congelamento (Cryomold, Sakura Finetek Europe). I tessuti sono stati congelati utilizzando 2-metil-butano (isopentano) raffreddato in azoto liquido. Criosezioni longitudinali seriate di tutti i gangli di ambo i lati (16 µm di spessore), ottenute al

criostato, sono state montate su vetrini gelatinizzati. Le sezioni ottenute, prive di coprioggetto, sono state immediatamente esaminate al microscopio a fluorescenza al fine di identificare i neuroni con il citoplasma marcato dal FB; successivamente sono state stoccate a -80°C in attesa delle successive analisi (Nissl, IB4 e IHC).

### **Immunoistochimica**

Utilizzando la metodica di immunofluorescenza indiretta si è eseguito uno studio di doppia marcatura. Grazie ai risultati di studi preliminari sulla stessa specie, si è deciso di utilizzare nella pre-incubazione e in tutte le soluzioni anticorpali, per abbattere il *background* (colorazione di fondo) siero normale al 20% ottenuto dalla specie animale da cui proveniva l'anticorpo secondario.

I tessuti sono stati pre-incubati in siero normale al 20% in PBS, per 1 ora, a temperatura ambiente (*room temperature*, RT). Le sezioni sono state quindi incubate *overnight* in camera umida a RT in una miscela di due anticorpi primari elencati nella Tabella 1.

**Tab. 1.** Anticorpi primari e IB4 usati in questo studio

Abbreviazioni: CGRP, peptide correlato al gene della calcitonina; IB4, isolectina B4, glicoproteina derivata dalla pianta *Griffonia simplicifolia*; NF200, neurofilamento ad alto peso molecolare (200 KDa); nNOS, ossido nitrico sintasi neuronale; SP, sostanza P; TRPV1, *transient receptor potential vanilloid 1*; VR1, recettore per la capsaicina

Antisiero	Immunogeno	Specie Ospite	Codice Siero	Diluizione	Fornitore
CGRP	CGRP-KLH (ratto)	Coniglio	C8198	1:6000	Sigma-Aldrich
NF200kDa	neurofilamento 200 da midollo spinale di bovino	Coniglio	N4142 #125K4814	1:200	Sigma-Aldrich
nNOS	Ossido nitric sintasi neuronale ricombinante umana	Coniglio	AB5380	1:3000	Chemicon
nNOS	aminoacidi 2-300 da NOS1 umano	Topo	(A-11) sc-5302	1:50	Santa Cruz
nNOS	peptide sintetico (1414-1434) (CRSESI AFIEESKKDTDEVFSS) di NOS1 di cervello umano, con aggiunto N-terminale Cys coniugato a KLH	Coniglio	SA-227 #T4254	1:200	Biomol
SP	Sostanza-P-BSA	Ratto	10-S15A Clone MO9205 Batch 115	1:500	Fitzgerald
SP	Sostanza P Sintetica (RPKPQQFFGLM-NH <sub>2</sub> ) accoppiata a KLH con carbodiimide.	Coniglio	20064 #313003	1:200	ImmunoStar
TRPV1	Peptide di 21 aminoacidi corrispondente al C-terminale della proteina del recettore della capsaicina (TGSLKPEDAEVFK DSMVPGEK)	Coniglio	AB5370	1:500	Millipore, Billerica, MA
TRPV1	Peptide (CEDAEVFK DSMVPGEK) corrispondente al residuo 824-838 del recettore TRPV1 di ratto	Coniglio	ACC-030	1:200	Alomone, Jerusalem, Israel
VR1 (P-19)	Peptide sintetico, sequenza aminoacidica (PHIFTTRSRTRLFGKGDSE(C)(38-57) dell'N-terminale del TRPV1 di ratto	Capra	Sc12498	1:50	Santa Cruz Biotechnology, CA
IB4	Lectina da <i>Bandeiraea simplicifolia</i> ( <i>Griffonia simplicifolia</i> ) Isolectins B4 (BSI-B4), biotina coniugata		L2140	1:100	Sigma-Aldrich

In seguito a lavaggio in PBS (3x10 minuti), i tessuti sono stati incubati per un ora a RT in camera umida in una miscela di due anticorpi secondari (Tabella 2). Le criosezioni sono state quindi lavate in PBS (3x10 minuti) e montati su vetrini gelatinizzati con il *buffer* glicerolo, pH 8,6.

**Tab. 2.** Anticorpi secondari usati in questo studio

Abbreviazioni: FITC, isotiocianato fluorescina; TRITC, isotiocianato tetrametil rodamina.

<b>Anticorpi</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Fornitore</b>
Goat anti-mouse IgG Alexa 594	1:200	Molecular Probes
Goat anti-mouse IgG 488	1:100	Biotium
Goat anti-rabbit IgG FITC	1:200	Calbiochem-Novabiochem
Goat anti-rabbit Alexa 594	1:100	Molecular Probes
Donkey anti-rat IgG Alexa 594	1:50	Molecular Probes
Streptavidin Texas Red-conjugated (SA-5006) #V0422	1:100	Vector Laboratories
Streptavidin Fluorescein-conjugated (SA-5001) #V0413	1:100	Vector Laboratories

#### **IB4 e colorazione immunoistochimica**

Le criosezioni selezionate sono state reidratate per 5 minuti in PBS. Visto che in questi esperimenti sono stati utilizzati i reagenti IB4 (coniugata con la biotina) e i reagenti coniugati con la streptavidina, al fine di evitare *background* dovuto alla presenza di avidina endogena, si è utilizzato un *kit* idoneo a inibire questo tipo di reazioni (Avidin/Biotin Blocking Kit). Le sezioni sono state incubate per 20 minuti in una soluzione di avidina, lavate per 5 minuti in PBS, nuovamente incubate per 20 minuti in una soluzione di biotina (Avidin/Biotin Blockin Kit, cat. no. SP-2001, Vector, Burlingame, CA), lavate per 5 minuti in PBS e quindi lasciate *overnight* in camera umida in una soluzione di IB4 in PBS. Il giorno seguente, dopo lavaggio con PBS (3x10 minuti), i tessuti sono stati incubati per 30 minuti a RT in camera umida in streptavidina coniugata con *Texas Red* o isotiocianato di fluoresceina (FITC); in seguito i tessuti sono stati lavati in PBS (3x10 minuti) e processati per le reazioni di IHC, come descritto sopra.

Le reazioni di marcatura con IB4 e di immunoistochimica sono state eseguite utilizzando i tessuti provenienti da almeno tre soggetti; per ogni animale sono stati valutati

e registrati almeno 100 neuroni per ogni marcatore utilizzato, in ogni combinazione di doppia marcatura.

Per determinare le proporzioni di ogni popolazione neuronale (CGRP, SP, nNOS, NF200, TRPV1 e IB4) in confronto alla popolazione neuronale gangliare totale, le sezioni a singola marcatura con ogni marcatore neuronale studiato sono state contro-colorate con una soluzione di Nissl verde fluorescente (NeuroTrace 500/525 *green fluorescent Nissl stain*, N21480, Molecular Probes, Eugene, OR). Differenze tra le proporzioni di singoli marcatori a differenti livelli dei DRG (L4-L6 e S2-S4) sono state valutate attraverso il test Chi-quadro. Un valore di  $P < 0,05$  è stato considerato significativo.

Le criosezioni contenenti neuroni FB-marcati sono state processate con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta, con singola o doppia marcatura, come già descritto in precedenza. Il test Chi-quadro è stato applicato per identificare differenze neurochimiche tra i neuroni FB-marcati localizzati nei gangli lombari e sacrali. Il livello di significatività è stato posto a  $P < 0,05$ .

Le preparazioni sono state esaminate con un microscopio Zeiss Axioplan (Axioplan epifluorescence microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) fornito di filtri per la luce ultravioletta (360 nm), per i fluorofori FITC e Alexa 488 (filtro di eccitazione 450-490 nm; filtro di emissione 515-565nm) e Alexa 594 e Texas Red (filtro di eccitazione 530-585 nm; filtro di emissione 575-615 nm).

Le immagini sono state registrate con una fotocamera digitale Polaroid DMC (Polaroid, Cambridge, CA) e software DMC 2. Leggere correzioni al contrasto e alla luminosità sono state effettuate usando Adobe (San Jose, CA) Photoshop CS, e le immagini sono state preparate usando Corel Draw (Mountain View, Ottawa, Canada).

Il software KS300 Zeiss (Kontron, Elektronik, Germany) è stato utilizzato per l'analisi morfometrica dei neuroni FB-marcati; sono stati considerati i corpi neuronali con nucleo evidente (vedi di seguito). Le aree dei neuroni FB-marcati dei gangli lombari (L4-L6) e sacrali (S2-S4) sono state misurate tracciando manualmente il perimetro dei neuroni. L'analisi statistica è stata eseguita per mezzo del test di ANOVA *one-way* in combinazione con *post-test* di Tukey. Tutte le analisi sono state eseguite usando *software* commerciali (Analyse-it, version 2.03, Analyse-it Software, Leeds, UK).

Il test ANOVA *one-way* è stato utilizzato per controllare la variabilità tra le aree dei neuroni dello stesso livello (gangli lombari o sacrali) in ogni singolo animale e tra

animali differenti. Lo stesso test è stato utilizzato per rilevare variazioni tra i gangli lombari e sacrali differenti in ogni animale. Infine tutti i dati dei gangli spinali lombari e sacrali sono stati sommati e analizzati statisticamente con il test ANOVA *one-way*. Il livello di significatività è stato posto a  $P < 0,05$ .

### **Caratterizzazione e specificità degli anticorpi**

La specificità degli anticorpi anti-CGRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), anti-nNOS (Chemicon/Millipore, Temecula, CA), anti-NF200 (Sigma-Aldrich) e anti-TRPV-1 (Rabbit anti-TRPV-1; Millipore, Billerica, MA) è stata testata con analisi Western blot.

L'anticorpo prodotto in coniglio contro il TRPV-1 (Millipore), che riconosce il C-terminale del recettore, è stato utilizzato da Obreja et al. (2008) su gangli spinali di maiale. Noi abbiamo testato un altro anticorpo prodotto nel coniglio (Alomone, Gerusalemme, Israele) la cui specificità sui tessuti di maiale è stata testata da Bratz et al. (2008). Per consentire gli esperimenti di co-localizzazione con gli altri anticorpi prodotti nel coniglio (anti-CGRP, anti-NF200) abbiamo inoltre utilizzato l'anticorpo anti-VR-1 (vanilloid receptor 1, P-19 sc-12498, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ottenuto dalla capra che riconosce l'N-terminale del recettore e che è stato recentemente testato con analisi Western blot da Pereira et al. (2010) su coltura cellulari di neuroni di DRG di maiale. I *data sheet* dei produttori di tutti gli anticorpi anti-TRPV-1 indicano che gli anticorpi sono specifici solo per neuroni dei gangli spinali di roditori (topo e ratto) e di uomo. Di conseguenza, abbiamo preventivamente testato la loro specificità su criosezioni di DRG toraco-lombari di ratto e lombo-sacrali di suino, usando un protocollo di doppia marcatura. Sulle criosezioni di DRG di ratto entrambi gli anticorpi anti-TRPV-1 prodotti in coniglio (Millipore e Alomone) e l'anticorpo anti-VR-1 prodotto in capra hanno mostrato piena co-localizzazione in tutti i neuroni, che apparivano fortemente marcati, fornendo valore addizionale alla specificità di tutti gli anticorpi anti-VR-1. Sfortunatamente non è stato possibile utilizzare il protocollo presente nella recente letteratura di Pereira et al., 2010, dato che l'anticorpo anti-VR-1 prodotto dalla capra (Santa Cruz Biotechnology) in questa ricerca non è riuscito a fornire nessuna immunoreattività sui tessuti di maiale. Entrambi gli anticorpi anti-TRPV-1 prodotti in coniglio (Millipore) hanno consentito una ottima immunolocalizzazione dei neuroni dei gangli spinali ma non sono riusciti a marcare le terminazioni sensitive del midollo spinale.

Si ritiene utile sottolineare che l'immunomarcatura ottenuta con entrambi gli anticorpi anti-TRPV-1 prodotti in coniglio è stata possibile solo dopo l'aggiunta di albumina sierica bovina (BSA; 1%) alle soluzioni di anticorpi primari e secondari. Inoltre si ritiene necessario evidenziare che, senza l'aggiunta di BSA (fortemente raccomandata dal fornitore Alomone), entrambi questi anticorpi hanno consentito una buonissima immunolocalizzazione soltanto su criosezioni di DRG al livello di L6.

E' stato possibile utilizzare solo gli anticorpi anti-TRPV-1 prodotti in coniglio (Alomone e Millipore). La doppia marcatura di TRPV-1 con CGRP e NF200 non è stata eseguita a causa dell'incompatibilità delle specie in cui erano stati prodotti gli antisieri.

L'anticorpo policlonale anti-nNOS ottenuto dal coniglio è stato inoltre testato con un protocollo di doppia marcatura insieme all'anticorpo monoclonale prodotto in topo ottenuto contro gli aminoacidi 2-300 di nNOS umano; i due anticorpi hanno mostrato corrispondente marcatura nelle fibre e nei pirenofori, fornendo ulteriore valore alla specificità dell'anticorpo anti-nNOS. L'anticorpo anti-nNOS prodotto in topo è stato anche testato usando un protocollo di doppia marcatura con un altro anticorpo policlonale prodotto nel coniglio ottenuto contro un peptide sintetico corrispondente agli amminoacidi 1414-1434 di nNOS di encefalo umano (Biomol, Plymouth Meeting, PA). Questi test indicano che i tre anticorpi anti nNOS, ottenuti contro differenti porzioni dell'antigene, riconoscono gli stessi corpi cellulari neuronali e le stesse fibre.

La specificità dell'anticorpo monoclonale anti-SP è stata testata dal fornitore (Fitzgerald, Concord, MA), il quale non ha riportato alcuna *cross*-reattività rinvenibile con Leu- o Met-encefalina, somatostatina o beta-endorfina. Questo antisiero è stato inoltre testato usando un protocollo di doppia colorazione con un altro antisiero (*rabbit* anti-SP, 20064, Immunostar, Hudson, WI) diretto contro la sostanza P sintetica (RPKPQQFFGLM) accoppiato a KLH con carbodiimide. ImmunoStar ha valutato il suo anticorpo anti-SP con test di assorbimento; questo anticorpo non *cross*-reagisce con neurochinina A, neurochinina B, somatostatina e neuropeptide K. I due anticorpi (Fitzgerald e ImmunoStar) sono stati totalmente co-localizzati. Inoltre, la sequenza di SP è molto ben conservata tra le specie di Mammiferi studiate (Holmgren e Jensen, 2001), con una identica sequenza di amminoacidi in alcuni Mammiferi come per la cavia, il bovino e il cavallo (RPKPQQFFGLM).

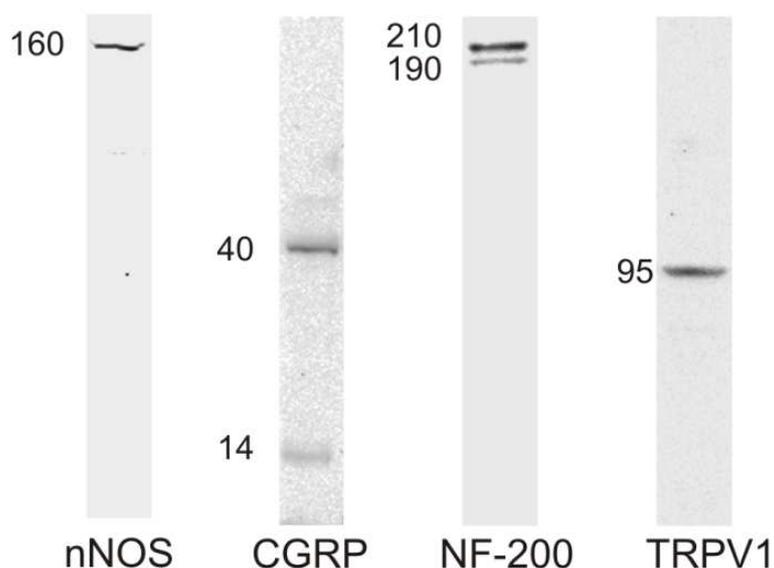
## Western blotting

I campioni di gangli spinali di maiale sono stati raccolti, congelati in azoto liquido e stoccati a  $-80^{\circ}\text{C}$ . In seguito, per l'analisi delle proteine i tessuti sono stati scongelati e omogeneizzati direttamente in una soluzione di lisi dodecil solfato di sodio (SDS) (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2%, 5% glicerolo) con 0,1 mM di fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF). Il contenuto proteico dei lisati cellulari è stato determinato con un *Protein Assay Kit* (TP0300, Sigma-Aldrich). Le diverse aliquote, contenenti 10  $\mu\text{g}$  di proteine, sono state separate su NuPage 4-12% bis-Tris Gel (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) per 50 minuti a 200 V. Le proteine sono state successivamente trasferite elettroforeticamente su una membrana di nitrocellulosa. Le macchie sono state lavate in PBS e in trasferimento proteico è stato controllato colorando le membrane di nitrocellulosa con Rosso di Ponceau al 2%. Dopo aver bloccato il trattamento, le membrane sono state incubate a  $4^{\circ}\text{C}$  durante la notte con i rispettivi anticorpi in *buffer* Tris saline-T20 (TBS-T20: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,1% T-20); anticorpo policlonale prodotto in coniglio anti- $\alpha\text{CGRP}$  (Sigma-Aldrich, 1:7.000); anticorpo monoclonale prodotto in topo anti-nNOS (Santa Cruz Biotechnology, 1:500); anticorpo policlonale prodotto in coniglio anti-NF200 (Sigma-Aldrich, 1:2.000); e anticorpo policlonale anti-TRPV-1 prodotto in coniglio (Millipore, 1:2.000). Dopo diversi lavaggi con PBS-T20, le membrane sono state incubate con anticorpo secondario coniugato con la biotina e successivamente con una diluizione 1:1.000 di un anticorpo anti biotina *horse-radish peroxidase (HRP)-linked*.

Le bande del Western sono state sviluppate usando un sub-strato chemiluminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) secondo le istruzioni del produttore. L'intensità del segnale luminescente delle bande risultanti è stato valutata con un Fluor-STM Multimager usando il software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA). L'analisi delle bande del Western ha confermato la specificità degli anticorpi primari utilizzati nel presente studio. La banda prodotta dall'anticorpo anti-nNOS ha un peso molecolare di approssimativo di 160 KDa (peso molecolare teorico 160 KDa; Fig. 1). La banda per l'anticorpo anti-CGRP ha mostrato un peso molecolare approssimativo di 14 KDa che corrisponde alla sequenza completa di pre-pro-peptide (peso molecolare teorico 14 KDa; Fig. 1). L'analisi dell'anticorpo anti-NF200 ha prodotto una doppia banda che mostrava pesi molecolari di 190 e 210 KDa (Fig. 1); questo risultato è coerente con la presenza di diverse isoforme

fosforilate già dimostrate da Petzold (2005). L'analisi delle bande Western per il TRPV-1 ha determinato una sola banda di peso molecolare pari a 95 KDa (peso molecolare teorico 95 KDa; Fig. 1).

**Fig. 1.** Immunomarcatura Western Blot di nNOS, CGRP, NF200 e TRPV-1 nel tessuto del ganglio spinale nel suino. Il numero sulla sinistra di ogni colonna indica il peso molecolare. La più bassa delle due bande della colonna del CGRP, di circa 14 KDa, corrisponde alla sequenza completa del pre-pro-peptide (peso molecolare teorico 14 KDa), mentre la banda superiore, di circa 40 KDa corrisponde alla colorazione non specifica dovuta all'anticorpo secondario. Le due bande della colonna dell'NF200 corrispondono alle isoforme fosforilate 190-KDa e 210-KDa della proteina; questo è compatibile con la presenza di varie isoforme fosforilate come riportato da Petzold (2005). Le immagini delle diverse bande sono state leggermente corrette nella luminosità e contrasto per fornire un sfondo uniforme.



### Specificità degli anticorpi secondari

La specificità degli anticorpi secondari è stata valutata applicandoli sul tessuto senza la presenza degli anticorpi primari. In seguito all'omissione degli anticorpi primari non vi sono state marcature di fibre e pirenofori.

Nei protocolli di doppia marcatura sono stati eseguiti anche esperimenti di controllo per verificare l'eventuale presenza di legami non specifici degli anticorpi secondari con gli anticorpi primari, omettendo entrambi gli anticorpi primari. Per escludere eventuali *cross*-reattività tra gli anticorpi primari e secondari si è eseguito un ulteriore esperimento incubando il tessuto con due anticorpi primari seguiti da un solo anticorpo secondario. Infine è stata eseguita la stessa procedura incubando ciascun anticorpo primario con l'anticorpo secondario appropriato, per assicurare che il *pattern* di marcatura per ogni anticorpo nelle sezioni doppiamente marcate fosse in accordo con quello osservato nelle sezioni a singola marcatura. Non è stata trovata prova di legami aspecifici.

### **Specificità dell'IB4**

La determinazione della specificità per la colorazione IB4 è stata eseguita pre-incubando la lectina biotilata in una soluzione 0,1 M di D-galattosio (Sigma-Aldrich) e N-acetilgalattosamina (Sigma-Aldrich). Tutte le procedure hanno eliminato reazioni specifiche della lectina.

### **Analisi quantitativa**

Il numero dei neuroni dei gangli spinali marcati dal FB è stato calcolato contando, nelle sezioni, soltanto le cellule nelle quali era riconoscibile il nucleo. Il numero dei neuroni FB-marcati è stato calcolato applicando la formula di Abercrombie (Abercrombie, 1946; Guillery, 2002); il fattore di correzione utilizza il rapporto  $T/T+h$ , dove  $T$  = spessore della sezione (16  $\mu\text{m}$ ) e  $h$  = diametro medio dei nuclei delle cellule FB-marcate; a tal fine è stato misurato il diametro medio ( $14\pm 2$   $\mu\text{m}$ ) dei nuclei di 100 neuroni considerando, nelle criosezioni colorate con il NeuroTrace, soltanto i nuclei nei quali era visibile il nucleolo. Il fattore di correzione era 0,53, il che significa che il numero delle cellule FB contate doveva essere moltiplicato per 0,53.

## Risultati

### *Immunoistochimica sui gangli spinali*

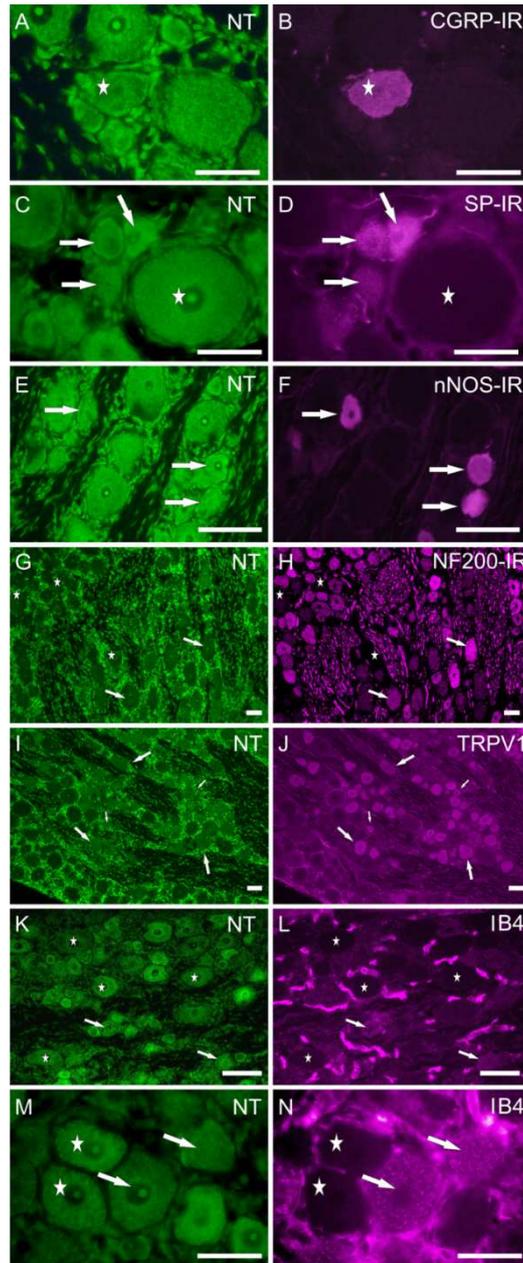
I neuroni CGRP-IR erano rispettivamente il 30±3% e 29±3% della popolazione neuronale totale dei gangli lombari e sacrali, mentre i neuroni SP-IR erano rispettivamente il 26±8% e 27±12% (Fig. 3c, D). I neuroni nNOS-IR sono stati il 21±4% nei neuroni lombari e il 26±7% nei neuroni sacrali (Fig. 3e, F). I neuroni NF200-IR erano il 75±14% dei neuroni lombari e l'81±7% di quelli sacrali (Fig. 3g, H). I neuroni TRPV1-IR erano il 48±13% nei gangli lombari e il 43±6% in quelli sacrali (Fig. 3i, J). Vale la pena notare che alcune cellule gliari (anfociti) hanno mostrato TRPV1-IR (dato non mostrato), come già osservato nelle cellule gliari di ratto (Doly et al., 2004).

La marcatura IB4 era presente nel 56±6% dei neuroni lombari e nel 43±10% di quelli sacrali (Fig. 3k, N). I vasi del midollo spinale, così come i gangli, hanno mostrato alta affinità per IB4 come precedentemente dimostrato da Luo et al. (1999) nel maiale e da Lorenzo et al. (2008) nel ratto (neonato). I dati sono riassunti nella Tabella 3.

**Tab. 3.** Percentuali dei marcatori neuronali NEi neuroni dei gangli spinali lombari e sacrali di maiale. Il NeuroTrace (NT) è stato utilizzato come marcatore pan-neuronale. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. Il numero di cellule contate è indicato in parentesi. Le conte sono state eseguite su tre animali.

Abbreviazioni: CGRP, peptide correlato al gene della calcitonina; IB4, isolectina B4, glicoproteina derivata dalla pianta *Griffonia simplicifolia*; NF200, neurofilamento ad alto peso molecolare (200 KDa); nNOS, ossido nitrico sintasi neuronale; SP, sostanza P; TRPV-1, *transient receptor potential vanilloid 1*.

<b>Marcatori</b>	<b>L4-L6</b>	<b>S2-S4</b>
CGRP/NT	30±3% (189/614)	29±3% (169/567)
IB4/NT	56±6% (300/542)	43±10% (240/556)
NF200/NT	75±14% (468/638)	81±7% (553/680)
nNOS/NT	21±4% (331/1558)	26±7% (194/682)
SP/NT	26±8% (195/765)	27±12% (157/552)
TRPV-1/NT	48±13% (972/2220)	43±6% (182/429)



**Fig. 2. A-N.** Immunoreattività a CGRP, SP, nNOS, NF200 e TRPV-1 e marcatura IB4 nei DRG suini, dove i neuroni sono stati colorati con NeuroTrace (A-M). A,B: la stella indica un neurone che era CGRP-IR (B). C,D: le frecce indicano i neuroni SP-IR (D), che erano generalmente più piccoli delle cellule SP negative (stella). E,F: le frecce indicano tre neuroni nNOS-IR (F). G,H: le frecce indicano due grandi neuroni che presentano NF200-immunoreattività (H); le stelle indicano neuroni più piccoli che erano NF200 negativi (H). I,J le tre frecce grandi indicano neuroni TRPV1-IR di grande taglia; le frecce piccole indicano TRPV-1-immunoreattività in piccoli neuroni. K,L: le frecce indicano due neuroni che mostravano marcatura IB4 intensa (L); le stelle indicano neuroni che non erano marcati IB4 (LJ). M,N: le frecce indicano due neuroni fortemente marcati IB4, mentre le stelle indicano due neuroni IB4 negativi. Scale bar = 50  $\mu$ m in A-D, M-N; 100  $\mu$ m in E-J, K-L.

## Co-localizzazioni

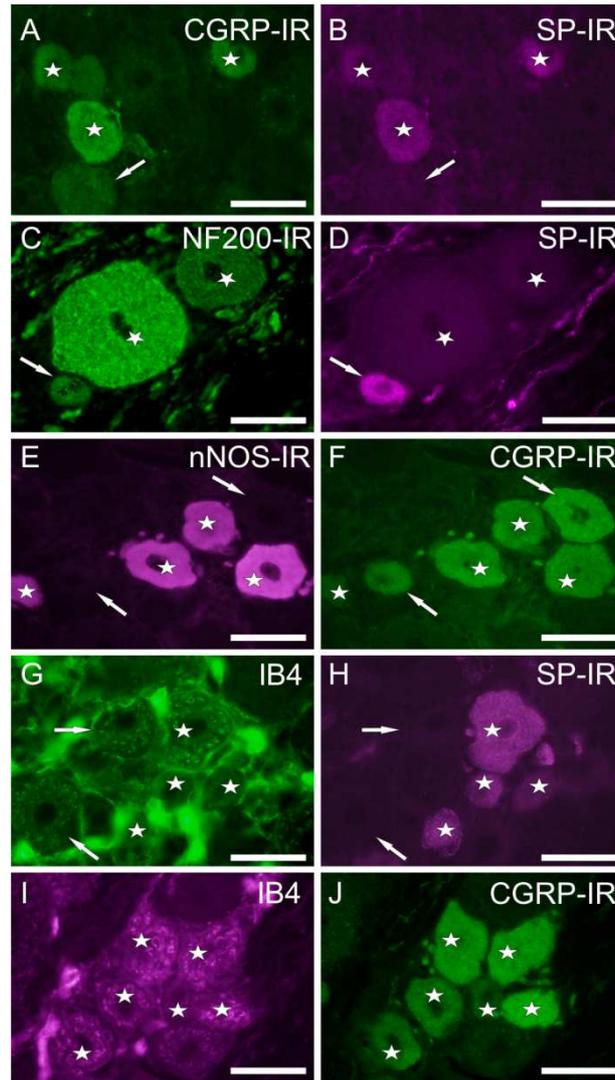
Quasi tutti i neuroni SP-IR hanno co-espresso CGRP-IR a livello lombare ( $99\pm 1\%$ ) e sacrale ( $98\pm 2\%$ ), mentre l' $86\pm 10\%$  dei neuroni CGRP-IR lombari e l' $85\pm 1\%$  di quelli sacrali erano anche SP-IR (Fig. 3A, B).

I neuroni SP-IR hanno inoltre espresso nNOS-IR (rispettivamente il  $56\pm 8\%$  dei neuroni sensitivi lombari e  $64\pm 12\%$  di quelli sacrali), mentre i neuroni nNOS-IR che co-esprimevano SP-IR sono stati il  $53\pm 7\%$  nei DRG lombari e il  $59\pm 6\%$  in quelli sacrali.

I neuroni SP-IR hanno ampiamente co-espresso NF200-IR ( $73\pm 10\%$  nei DRG lombari e  $73\pm 8\%$  in quelli sacrali) mentre un numero minore di cellule NF200-IR ha mostrato SP-IR ( $24\pm 4\%$  nei DRG lombari e il  $22\pm 7\%$  i quelli sacrali) (Fig. 3C, D).

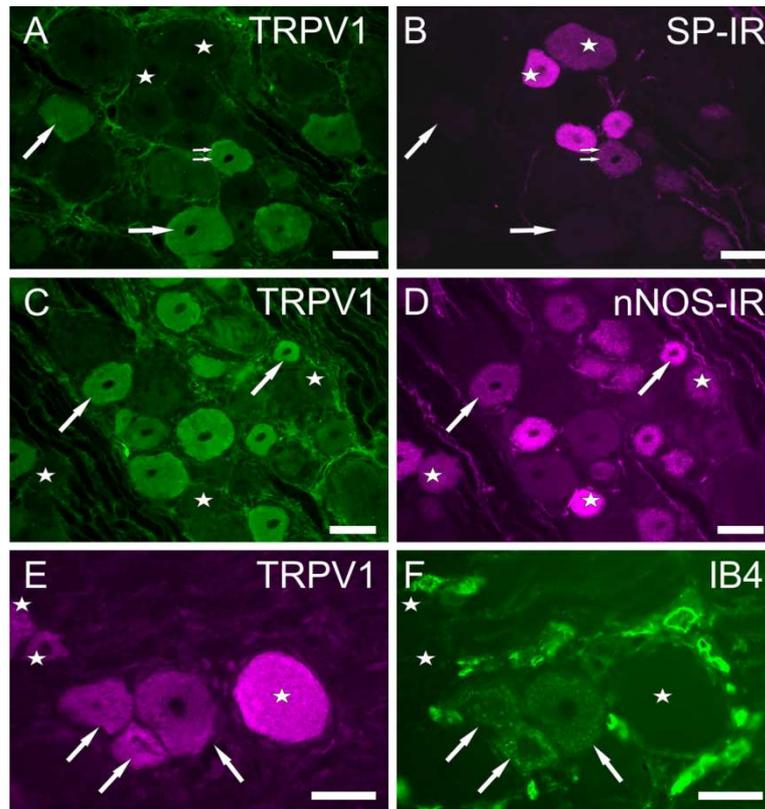
I neuroni CGRP-IR lombari e sacrali hanno inoltre presentato nNOS-IR (rispettivamente il  $64\pm 13\%$  e il  $73\pm 10\%$ ; Fig. 3E, F). Allo stesso modo, i neuroni nNOS-IR hanno co-espresso CGRP-IR ( $66\pm 13\%$  nei DRG lombari e  $53\pm 17\%$  nei DRG sacrali).

La marcatura IB4 è stata co-espressa dalla maggioranza dei neuroni nNOS-IR ( $96\pm 5\%$  nei DRG lombari e  $97\pm 3\%$  in quelli sacrali), seguita dai neuroni SP-IR ( $75\pm 16\%$  nei DRG lombari e  $83\pm 15\%$  in quelli sacrali; Fig. 3 G, H), dai neuroni CGRP-IR ( $65\pm 17\%$  nei DRG lombari e  $70\pm 16\%$  in quelli sacrali; Fig. 3 I, J), e dalle cellule NF200-IR ( $50\pm 16\%$  nei DRG lombari e  $47\pm 10\%$  in quelli sacrali). Tra i neuroni marcati IB4, la maggior parte delle cellule ha espresso NF200-IR in entrambi i livelli (lombari e sacrali), rispettivamente il  $93\pm 7\%$  e il  $92\pm 6\%$ , seguiti dalla co-espressione di un fenotipo peptidergico. Infatti, il  $72\pm 20\%$  delle cellule sacrali marcate IB4 lombari e il  $59\pm 20\%$  di quelle lombari hanno co-espresso anche il CGRP-IR (Fig. 3 I, J), mentre le cellule marcate IB4 co-localizzate con la SP-IR sono state rispettivamente il  $52\pm 3\%$  e il  $53\pm 16\%$  nei DRG lombari e sacrali,. I neuroni marcati IB4 che hanno espresso anche nNOS-IR sono stati il  $36\pm 5\%$  nei DRG lombari e il  $36\pm 8\%$  in quelli sacrali.



**Fig. 3.** A-J: Studi di co-localizzazione che mostrano immunoreattività a CGRP, SP, nNOS e NF200 e marcatura IB4 nei DRG lombosacrali suini. A, B: le stelle indicano neuroni CGRP-IR (A) che erano anche SP-IR (B), mentre la stella indica un neurone SP negativo CGRP-IR. C, D: le stelle indicano due grandi corpi NF200-IR © che erano SP negativi (D); la freccia indica un neurone NF200-IR tenue coesprimente forte SP-immunoreattività. E, F: le stelle indicano neuroni coesprimenti nNOS- (E) e CGRP-immunoreattività (F), mentre le stelle indicano neuroni che erano CGRP-IR ma nNOS negativi. G-J: le stelle indicano neuroni che presentano marcatura IB4 (G,I) e SP (H) e CGRP-immunoreattività (J); due frecce indicano neuroni marcati IB4 (G) che erano SP negativi. scale bar = 50  $\mu$ m in A-J.

I neuroni TRPV1-IR lombari e sacrali che hanno espresso SP-IR sono stati rispettivamente il  $30\pm 8\%$  e il  $26\pm 2\%$ , mentre i neuroni SP-IR che hanno espresso TRPV1-IR sono stati rispettivamente il  $47\pm 11\%$  e il  $60\pm 16\%$ , (Fig. 4 A, B).



**Fig. 4.** Studi di co-localizzazione che mostrano immunoreattività a TRPV-1, SP e nNOS e marcatura IB4 nei DRG lombo-sacrali suini. A, B: le stelle indicano due neuroni SP-IR che erano TRPV-1 negativi; le stelle grandi indicano due neuroni TRPV1-IR che erano SP negativi. Le piccole doppie frecce indicano un piccolo neurone che co-esprimeva SP- e TRPV-1-immunoreattività. C, D: le frecce indicano due neuroni TRPV1-IR co-espressanti nNOS-immunoreattività; le stelle indicano neuroni TRPV-1 negativi che mostrano nNOS-immunoreattività. E, F: le stelle mostrano neuroni TRPV1-IR che erano marcati IB4; le stelle indicano neuroni TRPV1-IR che erano IB4 negativi. Scale bar = 50  $\mu$ m in A-F.

I neuroni sensitivi TRPV1-IR lombari e sacrali che hanno co-espresso nNOS-IR sono stati il  $40\pm 19\%$  e il  $31\pm 12\%$ , rispettivamente, mentre i neuroni nNOS-IR che hanno co-espresso TRPV1-IR sono stati il  $62\pm 9\%$  e il  $78\pm 12\%$ , rispettivamente (Fig. 4 C,D). Tra i neuroni dei DRG lombari e sacrali TRPV1-IR, alte percentuali di cellule (rispettivamente il  $36\pm 12\%$  e il  $49\pm 18\%$ ,) erano co-localizzate con l'IB4; al contrario la maggior parte ( $95\pm 4\%$  dei lombari e  $89\pm 10\%$  dei sacrali) dei neuroni marcati IB4 hanno co-espresso TRPV1-IR (Fig. 4 E,F).

I dati sono riassunti nella tabella 4.

**Tab. 4.** Co-localizzazione (percentuale) dei marcatori nei neuroni di ganglio spinale lombare (L4-L6) e sacrale (S2-S4) di maiale

I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard, percento. Il numero di cellule contate è tra parentesi.

Le conte sono state tutte eseguite su tre animali (n=3).

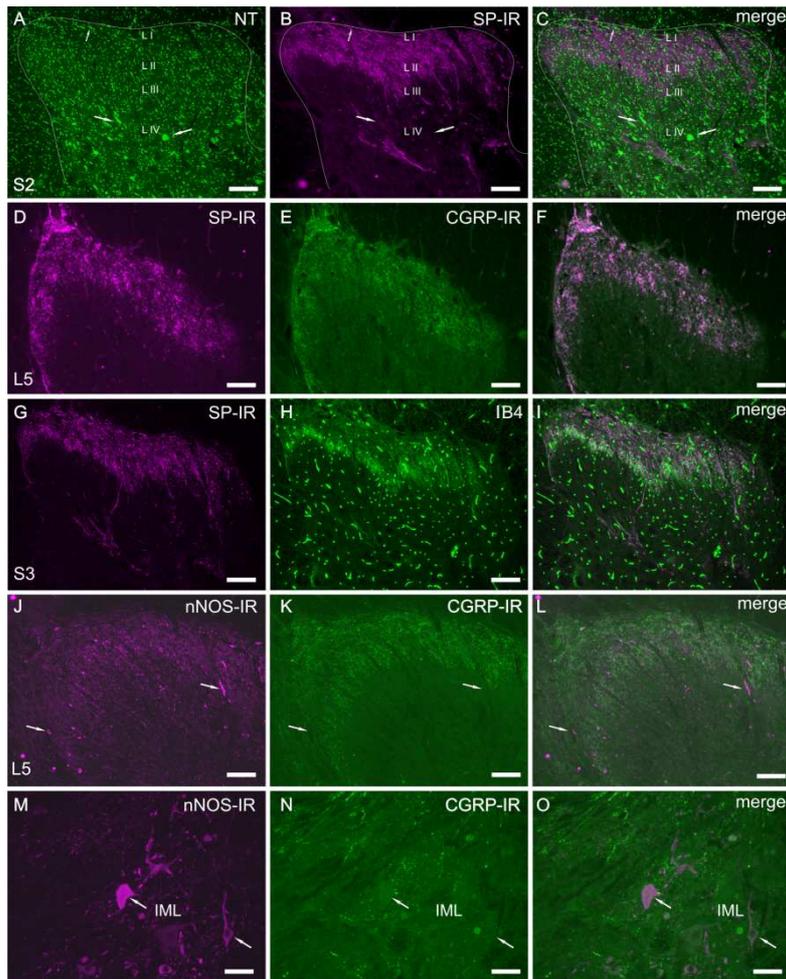
Abbreviazioni: CGRP, peptide correlato al gene della calcitonina; IB4, isolectina B4, glicoproteina derivata dalla pianta *Griffonia simplicifolia*; NF200, neurofilamento ad alto peso molecolare (200 KDa); nNOS, ossido nitrico sintasi neuronale; SP, sostanza P; TRPV-1, *transient receptor potential vanilloid 1*; nt, non testato.

CGRP	SP		nNOS		NF200		IB4		TRPV-1	
	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4
	86 $\pm$ 10% (528/656)	85 $\pm$ 1% (525/623)	64 $\pm$ 13% (385/562)	73 $\pm$ 10% (367/487)	nt	nt	65 $\pm$ 17% (398/657)	70 $\pm$ 16% (223/337)	nt	nt
SP	CGRP		nNOS		NF200		IB4		TRPV-1	
	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4
	99 $\pm$ 1% (437/441)	98 $\pm$ 2% (383/397)	56 $\pm$ 8% (198/365)	64 $\pm$ 12% (311/509)	73 $\pm$ 10% (348/449)	73 $\pm$ 8% (317/405)	75 $\pm$ 16% (343/472)	83 $\pm$ 15% (274/334)	47 $\pm$ 11 (149/319)	60 $\pm$ 16 (195/324)
nNOS	CGRP		SP		NF200		IB4		TRPV-1	
	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4
	66 $\pm$ 13% (408/583)	53 $\pm$ 17% (289/481)	53 $\pm$ 7% (214/414)	59 $\pm$ 6% (305/517)	nt	nt	96 $\pm$ 5% (559/582)	97 $\pm$ 3% (333/344)	62 $\pm$ 9 (202/329)	78 $\pm$ 12 (257/344)
NF200	CGRP		SP		nNOS		IB4		TRPV-1	
	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4
	nt	nt	24 $\pm$ 4% (153/636)	22 $\pm$ 7% (236/868)	nt	nt	50 $\pm$ 16% (176/342)	47 $\pm$ 10% (178/371)	nt	nt
IB4	CGRP		SP		nNOS		NF200		TRPV-1	
	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4
	72 $\pm$ 20% (385/515)	59 $\pm$ 20% (193/321)	52 $\pm$ 3% (279/530)	53 $\pm$ 16% (174/336)	36 $\pm$ 5% (259/708)	36 $\pm$ 8% (186/496)	93 $\pm$ 7% (317/341)	92 $\pm$ 6% (351/380)	95 $\pm$ 4 (292/305)	89 $\pm$ 10 (231/379)
TRPV-1	CGRP		SP		nNOS		NF200		IB4	
	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4	L4-L5	S2-S4
	Nt	Nt	30 $\pm$ 8 (97/330)	26 $\pm$ 2 (81/314)	40 $\pm$ 19 (221/499)	31 $\pm$ 12 (139/453)	nt	nt	36 $\pm$ 12 (131/366)	49 $\pm$ 18 (141/310)

## Midollo spinale

Per determinare la laminazione del midollo spinale, abbiamo impiegato il metodo di doppia colorazione NeuroTrace/SP e CGRP (Fig. 5 A) su sezioni vicine a quelle in cui avevamo impiegato i marcatori neuronali. Il NeuroTrace (NT) sembra essere il marcatore più affidabile (Lorenzo et al., 2008). I risultati ottenuti sono stati comparati con le descrizioni della laminazione del midollo spinale dei grandi Mammiferi (Barone e

Bortolami, 2004). Nella lamina I erano presenti pochi e piccoli neuroni fusiformi, orientati parallelamente alla superficie convessa del corno dorsale (Fig. 5 A). Nelle lamine II e III era osservabile una popolazione omogenea di piccoli neuroni, con l'asse maggiore orientato parallelamente all'asse maggiore del corno dorsale. Nella lamina IV erano presenti neuroni di dimensioni eterogenee, alcune cellule erano grandi e di forma irregolare (Fig. 5 A). Quindi, mentre è stato più facile riconoscere il limite tra la lamina III e la lamina IV, è stato più difficile distinguere il limite le lamine II e III.



**Fig. 5. A-L:** Studi di co-localizzazione che mostrano immunoreattività nel corno dorsale di L5 (D, J) e nei segmenti S2-S3 di midollo spinale (A, G) a: SP, CGRP, nNOS e IB4 . A-C: immagini che mostrano la marcatura con il NT e SP-IR nelle prime lamine del midollo spinale sacrale. Sono indicati il profilo del corno dorsale e la posizione delle prime lamine (L I-IV). Le frecce indicano neuroni di taglia media localizzati nella lamina IV. D-F: immagini che mostrano fibre e varicosità SP- e CGRP-IR distribuite nelle lamine I, II ( e III) dei corni dorsali; l'immagine di sovrapposizione (*merge*) (F) focalizza l'ampio grado di co-localizzazione tra neuropeptidi. G-I: immagini che mostrano la distribuzione delle fibre e delle varicosità SP-IR (G) e marcate IB4 (H) nel midollo spinale sacrale. Nelle immagini di *merge* (I) è osservabile l'ampia co-localizzazione SP/IB4 nelle lamine I-II e che l'IB4 era più concentrato nella lamina II. È degno di nota che l'IB4 ha inoltre fortemente marcato i vasi sanguigni del midollo spinale. J-L: Immagini della distribuzione delle fibre e delle varicosità nNOS- e CGRP-IR negli strati superficiali del midollo spinale lombare; le varicosità nNOS-IR hanno mostrato un *target* di distribuzione più ampio rispetto a quelle CGRP-IR. Neuroni piccoli e medi nNOS-IR (frecce) sono stati osservati nelle lamine superficiali. M-O: immagine dei neuroni e delle fibre nNOS-IR e fibre CGRP-IR nel nucleo intermedio-laterale (IML) del midollo spinale (L5). Le frecce indicano i neuroni nNOS-IR (M) circondati dalle fibre CGRP-IR (N, O). Scale bar=100 μm in A-O.

Le marcature con anticopri anti-CGRP- e SP-IR e la colorazione con IB4 hanno mostrato distribuzione simile nelle lamine del midollo spinale (Fig. 5 D-F). In particolare le fibre e le varicosità CGRP- e SP-IR erano localizzate nelle lamine I e II con una moderata presenza nella lamina III, mentre la positività all'IB4 era più concentrata nella lamina II (Fig. 5 E, H). Nelle lamine più profonde (IV-VI) sono state inoltre osservate fibre e varicosità CGRP-IR, SP-IR e marcate IB4, sparse ed isolate, tanto nei segmenti lombari del midollo spinale quanto in quelle sacrali. Alcune fibre marcate sono state osservate lateralmente e medialmente al corno dorsale, al livello della commessura grigia dorsale (lamina X); i neuroni simpatici e parasimpatici sono stati osservati al livello del midollo spinale (lamina VII) lombare e sacrale. Il livello dell'intensità della marcatura può essere così riassunto: SP > CGRP > IB4. Una densa marcatura IB4 è stata osservata intorno al canale centrale (cellule ependimali). Le fibre e le varicosità nNOS-IR erano meno concentrate nelle prime lamine (I-II), ma erano presenti anche nelle lamine III e IV.

Inoltre nel corno dorsale e nella lamina X della sostanza grigia sono stati osservati neuroni allungati nNOS-IR (Fig. 5 J, L); queste cellule erano tuttavia rare nelle corna ventrali. Nel nucleo intermedio-laterale lombare erano raggruppati grandi neuroni nNOS-IR (Fig. 5M-O), ma non nel nucleo parasimpatico sacrale. Nelle cellule ependimali è stato osservato una reattività all'nNOS-IR (dato non mostrato). TRPV1-IR era totalmente assente nei segmenti L5 di midollo spinale. Non è stato possibile inoltre osservare TRPV1-IR nel segmento L6 del midollo spinale, (segmento corrispondente al ganglio L6), nel quale la TRPV1-IR era maggiormente espressa.

## **Iniezione del tracciante**

### *Specificità dei siti di iniezione*

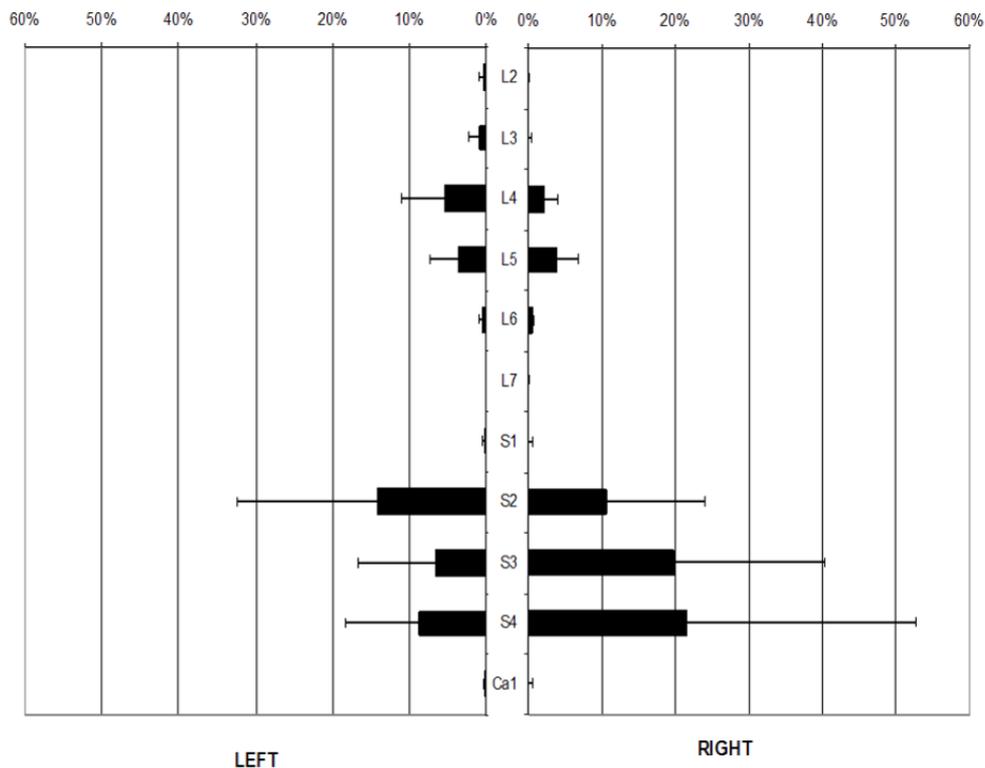
I siti delle iniezioni con il FB sono stati facilmente identificati per la presenza del deposito giallastro lasciato dal tracciante nel sito di iniezione. Per verificare che il tracciante non fosse migrato nell'uretra, abbiamo analizzato, in criosezioni e per mezzo di tecnica di colorazione istologica ematossilina-eosina, la giunzione tra l'UBT e la porzione craniale dell'uretra. In tutti i 5 soggetti il tracciante era confinato all'interno della muscolatura liscia dell'UBT. Per verificare se ci fosse tracciante diffuso nel muscolo

sfintere uretrale (muscolo striato a controllo volontario), abbiamo anche analizzato sezioni trasversali del midollo spinale L7 e S1-S3, sede dei motoneuroni (Nucleo di Onuf) responsabili dell'innervazione del muscolo uretrale (le fibre viaggiano nel nervo pudendo); dati sono disponibili per quanto riguarda l'uomo (Onufrowicz, 1889; Pullen et al., 1997), la scimmia (Ueyama et al., 1985; Roppolo et al., 1985), il cane e il gatto (Kuzuhara et al., 1980; Ueyama et al., 1984) e le specie murine (McKenna e Nadelhaft, 1986; Polak e Freeman, 2010).

La letteratura non fornisce informazioni relative alla posizione dei neuroni del nucleo di Onuf destinati al muscolo uretrale nel maiale; al contrario esistono dati relativi al contingente neuronale destinato allo sfintere anale esterno del maiale (Blok et al., 1996; Bo Minelli et al., 2003), al muscolo bulbo-spongioso (Botti et al., 2009) e al muscolo ischio-cavernoso (Bo Minelli et al., 2000, 2001). Nel maiale i neuroni destinati al muscolo bulbo-spongioso occupano una posizione dorso-laterale rispetto al canale centrale del midollo spinale S1-S2. I neuroni destinati al muscolo ischiocavernoso sono distribuiti invece nella parte centrale del corno ventrale dei segmenti S1-S2. A riprova che nella presente ricerca non è stato inavvertitamente iniettato il muscolo uretrale non sono stati osservati neuroni FB-positivi nei segmenti L7-S3 del midollo spinale

### **Marcatura neuronale con il tracciante FB**

I neuroni sensitivi marcati dal FB hanno mostrato un *pattern* di distribuzione particolare; questi presentavano distribuzione asimmetrica lungo il tratto compreso tra L2 e Ca1 ed erano però concentrati soprattutto nei segmenti L4-L5 e S2-S4 (Fig. 6). Il numero totale medio dei neuroni era di  $418 \pm 132$  (media  $\pm$  Dev. Stand, n=4), il  $41 \pm 18\%$  dei quali era localizzato nei gangli di sinistra e il  $59 \pm 18\%$  in quelli di destra. La distribuzione dei neuroni FB-marcati nei gangli spinali sacrali S2-S4 superava nettamente il numero dei neuroni trovati nei gangli spinali lombari L4-L5 (rispettivamente il  $82 \pm 6\%$  e il  $9 \pm 7\%$ ).



**Fig. 6.** Diagramma a barre che mostra la distribuzione segmentale dei neuroni sensitivi del trigono della vescica urinaria (UBT) identificati dopo l'iniezione del Fast Blue nel UBT di maiale. Le barre rappresentano le percentuali medie dei neuroni localizzati nei gangli spinali di entrambi i lati. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard.

Il numero più alto di neuroni FB-marcato osservato in questi segmenti è stato di 319 cellule in S4 (pig-1), 247 cellule in S3 (pig-3), 146 cellule in S2 (pig-4), 50 cellule in L5 (pig-3), e 51 cellule in L4 (pig-4). La maggior parte dei neuroni sensitivi marcati erano concentrati nel polo prossimale dei gangli spinali.

### **Analisi morfometrica dei neuroni sensitivi marcati con il FB**

Le aree dei neuroni lombari (L4-L6) e sacrali (S2-S4) FB-marcato sono state misurate manualmente. Nel presente studio, i neuroni dei DRG sono stati suddivisi, sulla base della classificazione di Bossowska et al. (2009), in tre categorie: 1) piccoli (neuroni con un diametro fino a 30  $\mu\text{m}$ , corrispondenti a un'area < di 700  $\mu\text{m}^2$ ); 2) medi (neuroni con un diametro medio da 31 a 50  $\mu\text{m}$ , corrispondente ad un'area da 700 a 2000  $\mu\text{m}^2$ ); 3)

grandi (neuroni con un diametro oltre i 51  $\mu\text{m}$ , corrispondente ad un'area  $>$  di 2000  $\mu\text{m}^2$ ). Considerando tutti i neuroni FB-positivi, il 54,2% (383/706 cellule, n=4) dei neuroni marcati erano piccoli, il 42,4% (299/706 cellule, n=4) erano medi e solo il 3,4% (24/706 cellule, n=4) erano grandi. Separatamente, abbiamo potuto suddividere i neuroni lombari in piccoli (29,3%, 55/188 cellule, n=4), medi (61,7%, 116/188 cellule, n=4), e grandi (9%, 17/188 cellule, n=4); al contrario, la maggior parte dei neuroni sacrali era di piccola taglia (63,3%, 328/518 cellule, n=4), seguita da 35,3% di neuroni medi (183/518 cellule, n=4) e 1,4% di neuroni grandi (7/518 cellule, n=4).

Nel presente studio non è stata rinvenuta variabilità tra i gangli spinali dello stesso livello (lombare o sacrale) dello stesso animale ( $P > 0,09$ ); i dati riassunti nella tabella 5 mostrano che in tutti gli animali il valore medio dell'area dei neuroni lombari FB-marcati era significativamente più grande (a volte mostrando forte significatività statistica) di quello dei neuroni sacrali FB-marcato (ANOVA one-way,  $P < 0,0001$ ). Inoltre, quando sono stati considerati insieme tutti i valori medi dell'area dei neuroni lombari e sacrali FB-marcati, la dimensione dei neuroni FB-marcati al livello lombare ha evidenziato una differenza estremamente significativa rispetto a quella dei sacrali, cioè rispettivamente di  $1112 \pm 624 \mu\text{m}^2$  (diametro medio =  $37 \pm 10 \mu\text{m}$ ) e di  $716 \pm 421 \mu\text{m}^2$  (diametro medio =  $29 \pm 8 \mu\text{m}$ ).

**Tab. 5.** Area dei neuroni destinati all'innervazione sensitiva del trigono della vescica urinaria di maiale marcati con il Fast Blue. I neuroni utilizzati per quest'analisi erano distribuiti nei gangli spinali L4-L6 e S2-S4 (quattro animali utilizzati). È indicato il peso corporeo di ogni soggetto. Il numero di neuroni misurati per ogni soggetto è tra parentesi.

	Gangli spinali	
	L4- L6	S2-S4
	Valore medio dell'area di sezione	Valore medio dell'area di sezione
<b>Suino 1</b> Peso 33 Kg	$1152 \pm 554 \mu\text{m}^2$ (44)	$721 \pm 439 \mu\text{m}^2$ (229)
<b>Suino 2</b> Peso 38 Kg	$1071 \pm 785 \mu\text{m}^2$ (53)	$733 \pm 513 \mu\text{m}^2$ (61)
<b>Suino 3</b> Peso 30 Kg	$1282 \pm 581 \mu\text{m}^2$ (44)	$675 \pm 281 \mu\text{m}^2$ (123)
<b>Suino 4</b> Peso 33 Kg	$962 \pm 479 \mu\text{m}^2$ (47)	$742 \pm 459 \mu\text{m}^2$ (107)
<b>Suini 1-4</b>	$1112 \pm 624 \mu\text{m}^2$ (188)	$716 \pm 421 \mu\text{m}^2$ (521)

### Immunoistochimica dei neuroni marcati dal FB

Sebbene in misura differente, i neuroni FB-positivi erano positivi a tutti i marcatori utilizzati, cioè CGRP, SP, nNOS, NF200, TRPV-1 e IB4 (Fig. 7A-F). Gran parte dei neuroni FB-marcati ha espresso un fenotipo peptidergico al livello lombare. Infatti, l'immunoreattività al CGRP e alla SP è stata significativamente più abbondante nei neuroni lombari ( $56\pm9\%$ ,  $39\pm15\%$ , rispettivamente) che in quelli sacrali ( $16\pm6\%$ ,  $16\pm11\%$ , rispettivamente). Anche i neuroni nNOS-IR FB-marcati erano significativamente più rappresentati nei gangli lombari ( $17\pm13\%$ ) rispetto a quelli sacrali ( $6\pm1\%$ ). Stesso discorso per i neuroni TRPV1-IR, che erano il  $62\pm10\%$  nei gangli lombari e il  $45\pm24\%$  in quelli sacrali. L'NF200-IR è stata espressa dal  $64\pm33\%$  dei neuroni lombari e il  $58\pm12\%$  di quelli sacrali.

Le cellule marcate IB4 erano rispettivamente il  $67\pm19\%$  e il  $48\pm16\%$  dei neuroni lombari e sacrali. I dati sono riassunti nella tabella 6.

**Fig. 6.** Diagramma a barre che mostra la distribuzione segmentale dei neuroni sensitivi del trigono della vescica urinaria (UBT) identificati dopo l'iniezione del tracciante fluorescente a trasporto retrogrado Fast Blue nel UBT di maiale. Le barre rappresentano le percentuali medie dei neuroni localizzati nei DRG. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard.

	L4-L5	S2-S4
CGRP/FB	$56\pm9\%$ (62%), 37/60 cellule (n=3)	$16\pm6\%$ (16%), 47/284 cellule (n=3)
IB4/FB	$67\pm19\%$ (69%), 51/74 cellule (n=4)	$48\pm16\%$ (57%), 301/529 cellule (n=4)
NF200/FB	$64\pm33\%$ (66%), 46/70 cellule (n=4)	$58\pm12\%$ (66%), 258/392 cellule (n=3)
nNOS/FB	$17\pm13\%$ (20%), 14/75 cellule (n=4)	$6\pm1\%$ (6%), 17/294 cellule (n=5)
SP/FB	$39\pm15\%$ (42%), 30/71 cellule (n=5)	$16\pm11\%$ (25%), 147/584 cellule (n=5)
TRPV1/FB	$62\pm10\%$ (67%), 46/69 cellule (n=3)	$45\pm24\%$ (38%), 64/168 cellule (n=3)

Gli esperimenti di co-localizzazione hanno evidenziato che alcuni neuroni FB-positivi co-esprimevano anche uno o due degli altri anticorpi utilizzati nella ricerca. Quasi tutti i neuroni SP-IR erano anche CGRP-IR, mentre alcuni di quelli esperimenti CGRP-IR erano SP-negativi (Fig. 7A-C). I neuroni CGRP- (8/16 cellule contate) e SP-IR esprimevano anche nNOS-IR. Grandi percentuali di neuroni marcati IB4 hanno presentato SP- ( $48\%$ , 22/47 cellule; Fig. 7G-I) e NF200-IR ( $34\%$ , 38/113 cellule; Fig. 7J-L).

Inaspettatamente, nonostante l'alto grado di co-localizzazione dei marcatori impiegati, soltanto i neuroni nocicettivi lombari dell'UBT (TRPV1-IR) co-esprimevano SP-IR (27%, 8/30 cellule), mentre nessun neurone è stato contato nei gangli spinali sacrali (0/34 cellule). Piccole percentuali di neuroni sensitivi nocicettivi dell'UBT co-esprimenti nNOS-IR sono stati osservati nei DRG lombari (6%, 2/33 cellule) e sacrali (3%, 1/34 cellule), mentre neuroni TRPV1-IR che erano marcati IB4 erano più rappresentati nei DRG lombari e sacrali (rispettivamente il 52% e il 33%,).

## **Discussione**

### ***Distribuzione dei singoli marcatori nei gangli spinali***

L'espressione di CGRP, SP e nNOS nei gangli varia ampiamente tra le specie e anche tra i differenti livelli dei gangli della stessa specie (Kai-Kai, 1989; Lawson, 1995; Kashiba, 1999; Zwick, et al. 2002; Weissner, 2006; Price e Flores, 2007; Tan, 2008; Bombardi, 2010; Russo et al., 2010a, 2011a).

I nostri risultati indicano che i neuroni CGRP-IR erano meno rappresentati rispetto a quelli presenti

negli stessi gangli di altri grandi Mammiferi (Russo et al. 2010a, 2011a), mentre la percentuale dei neuroni SP-IR era simile a quella osservata nel cavallo (Russo et al., 2011a) ma meno di quanto è stato dimostrato nella pecora (Russo et al., 2010a).

Le percentuali dei neuroni nNOS-IR lombari e sacrali erano molto vicine a quelle osservate nel cavallo (Russo et al. 2011a) ma inferiori a quelle ottenute nella pecora (Russo et al., 2010a). È degno di nota mettere in evidenza che i neuroni nNOS-IR erano significativamente più abbondanti al livello sacrale; questo potrebbe essere correlato al più ampio coinvolgimento di neuroni nNOS-IR nella innervazione viscerale (Aimi et al., 1991). In generale i dati disponibili nei grandi Mammiferi differiscono sostanzialmente da quelli nei piccoli roditori, sia quantitativamente che qualitativamente. In tutti i grandi Mammiferi studiati, cioè scimmia (*Macaca mulatta*; Zhang et al., 1993), pecora (Russo et al., 2010a), cavallo (Russo et al., 2011a), cane (Lukàkovà et al., 2006) e maiale (la presente ricerca), i neuroni DRG lombari nNOS-IR sono sempre stati osservati in percentuali più alte di quelle riportate nei DRG di topo e ratto. Questi dati

potrebbero sottolineare un più importante ruolo degli nNOS nei DRG dei grandi Mammiferi rispetto a quello dei piccoli.

Infatti la presenza di percentuali più grandi di neuroni DRG nNOS-IR potrebbe essere correlata con il coinvolgimento dell'ossido nitrico nella percezione viscerale. Sulla base dei dati quantitativi riportati nella letteratura sulla distribuzione nei DRG di nNOS-IR, è possibile classificare i Mammiferi studiati nella seguente successione di quantità sempre minori di nNOS-IR: pecora > cavallo > maiale > scimmia > piccoli roditori (Aimi et al., 1991; Zhang et al., 1993; Russo et al., 2010a; Russo et al., 2011a; presente ricerca). È interessante notare che la complessa organizzazione del sistema digerente dei grandi Mammiferi diminuisce nello stesso ordine della sequenza quantitativa dell'nNOS-IR, essendo il sistema digerente della pecora (Ruminante) il più complesso in termini assoluti, e quello dei piccoli roditori il più semplice in termini di anatomia e organizzazione funzionale.

Il livello dell'espressione dell'NF200 dovrebbe essere correlato al calibro del neurite e al suo grado di mielinizzazione (Lawson et al. 1993). Inoltre l'NF200 è considerato un marcatore classico dei neuroni *light chiari* alla colorazione di Nissl (Lawson et al. 1984). I neuroni NF200-IR sacrali del maiale erano significativamente più numerosi di quelli lombari (81% vs. 75%), ma ad oggi non siamo in grado di spiegare questa differenza. Il più alto grado di mielinizzazione nei gangli di maiale rispetto a quelli dei roditori è coerente con i dati riportati nel cavallo (Russo et al., 2011b) e potrebbe essere un importante adattamento evolutivo innescante una azione riflessa veloce ad uno stimolo doloroso.

È stato osservato che nei gangli toraco-lombari di maiale (Obreja et al., 2008) e di ratto (osservazione personale R. Chiocchetti) una grande percentuale (circa il 55%) di neuroni esprimeva TRPV1-IR mentre nei gangli lombari di topo la percentuale è inferiore (~23%) (Zwick et al., 2002). Obreja et al. (2008) hanno usato uno degli anticorpi utilizzati in questo studio (Millipore) per marcare i neuroni gangliari di maiale in coltura. I nostri dati, ottenuti anch'essi con l'utilizzo di un altro anticorpo anti-TRPV-1 (Alomone), sono coerenti con quelli osservati nel ratto e nel maiale.

È interessante notare che nei nostri esperimenti sul maiale, sebbene l'anticorpo anti-TRPV1 prodotto nel coniglio (Millipore) mostrasse una immuno-marcatura non del tutto adeguata in tutti i DRG lombari e sacrali, esso era perfettamente in grado di

individuare questo recettore nei neuroni del solo ganglio L6; inoltre, nelle sezioni L4-L6 di midollo spinale non è stata osservata alcuna marcatura. È evidente che, sebbene la sequenza proteica del TRPV-1 di maiale sia altamente conservata (>83%) tra le specie dei Mammiferi (Ohta et al. 2005) e mostri alcune similarità farmacologiche con il TRPV1 umano, ci sono comunque grandi differenze nell'espressione antigenica delle grandi specie. La mancanza di sei amminoacidi nella regione C-terminale del TRPV1 suino può alterare la risposta dei neuroni sensitivi di maiale a questo anticorpo specificamente diretto al C-terminale del TRPV1 di ratto.

Ciononostante, anche l'altro anticorpo anti-TRPV1 utilizzato (Santa Cruz Biotechnology), che è specificamente diretto contro l'N-terminale del recettore, è stato incapace di identificare neuroni nocicettivi nel maiale ma non nel ratto. È verosimile che gli anticorpi disponibili commercialmente, specificamente prodotti per roditori di laboratorio, non riconoscano lo stesso epitopo nei grandi Mammiferi. Sebbene molte proteine neuronali siano altamente preservate in diverse specie (dalle piccole alle grandi), i ricercatori che lavorano sulle grandi specie spesso incontrano questo tipo di problema. La discrepanza tra i nostri dati e quelli ottenuti da Obeja et al. (2008) e Pereira et al. (2010) potrebbe forse essere correlata alle diverse condizioni sperimentali; infatti è importante sottolineare che questi autori hanno lavorato su neuroni DRG coltivati. A supporto dei nostri risultati, cioè la presenza di forte TRPV1-IR nei gangli L6, Kiasalari et al. (2010) hanno recentemente osservato che l'immunoreattività al TRPV1 era fortemente espressa in particolare dai neuroni dei gangli spinali di ratto.

Da nostro personale punto di vista, soltanto il terzo anticorpo anti-TRPV1 utilizzato (Alomone) può essere considerato utilizzabile nelle criosezioni. È veramente strano che, sebbene gli anticorpi Millipore e Alomone condividano 15 dei 21 amminoacidi del terminale carbonilico della recettore proteina capsaicina del topo, solo l'anticorpo diretto alla sequenza più corta (Alomone) sia perfettamente in grado di rilevare il TRPV1-IR nelle sezioni dei gangli, ma non nel midollo spinale.

L'IB4 è considerato un marcatore di neuroni non-peptidergici soltanto nei topi (Zwick et al., 2002; Robinson et al., 2004), anche se un basso grado di co-localizzazione con il CGRP è stata dimostrata anche in questa specie (Robinson et al., 2004; osservazione personale, D. Russo e R. Chiocchetti). Molti degli studi disponibili in letteratura hanno dimostrato, in realtà, che i neuroni dei gangli spinali marcati con l'IB4

esprimevano anche CGRP e/o SP (Wang et al., 1994; Kashiba et al., 2001; Price e Flores, 2007; Russo et al., 2010a; presente ricerca). In letteratura, la percentuale dei neuroni marcati IB4 dei gangli spinali varia tra il 29 e l'80% (Kashiba et al., 1999; Gerke e Plenderleith, 2002; Zwick et al., 2002; Obreja et al., 2008; Russo et al. 2010a). Nel maiale i neuroni marcati con l'IB4 erano più numerosi di quelli osservati nel cavallo (Russo et al., 2011a) ma meno numerosi di quelli osservati nella pecora (Russo et al., 2010a). Obreja et al., (2008) hanno contato una percentuale più piccola (29%) di neuroni marcati con l'IB4 nei neuroni in coltura dei gangli spinali toraco-lombari di maiale. È interessante notare che nel nostro studio i neuroni lombari marcati con l'IB4 erano significativamente più numerosi di quelli sacrali, questo suggerisce una prevalente funzione nocicettiva dei neuroni dei gangli lombari. Altri studi presenti in letteratura suggeriscono che l'IB4 possa essere espresso selettivamente dai neuroni sensitivi primari nocicettivi in diverse specie Mammifere (Guo et al., 1999; Michael e Priestly, 1999; Gerke e Plenderleith, 2001, 2020; Breese et al., 2005; presente ricerca) (vedi sotto).

### ***Studio di co-localizzazione***

Gli esperimenti di co-localizzazione hanno evidenziato alcune caratteristiche dei gangli spinali dei grandi Mammiferi. Esse possono essere riassunte nel modo seguente:

1. diversamente dal ratto (Bergman et al., 1999) e dal topo (Tan et al., 2008) una grande percentuale di neuroni CGRP-IR sono anche nNOS-IR, indicando un codice neurochimico che potrebbe essere considerato tipico dei neuroni dei gangli spinali dei grandi Mammiferi (Russo et al., 2010a,2011a);

2. le percentuali dei neuroni co-esprimenti SP-IR e nNOS-IR sono più alte nel maiale, nella pecora (Russo et al., 2010a) e nel cavallo (Russo et al., 2011a) rispetto a quelle che si possono riscontrare nei roditori (Aimi et al., 1991; Tan et al., 2008);

3. allo stesso modo le percentuali di neuroni co-esprimenti SP-IR e NF200-IR sono più alte nel maiale, rispetto al ratto (McCarthy e Lawson ,1989) o al cavallo (Russo et al., 2011b);

4. infine un'altra tipica caratteristica dei grandi Mammiferi è che i gangli spinali rappresentano un'alta e mutua co-localizzazione tra nNOS e IB4; al contrario nel topo, dove il grado di co-localizzazione è basso (Tan et al., 2008), probabilmente a causa di un minor coinvolgimento dei neuroni marcati IB4 nella innervazione viscerale del topo.

È nostra opinione che bisognerebbe tenere conto di tutte le differenze riscontrate tra i neuroni dei gangli spinali di piccoli e grandi Mammiferi nella scelta di un animale come modello sperimentale. È plausibile che i neuroni dei gangli spinali dell'uomo siano più simili ai neuroni DRG dei grandi Mammiferi rispetto a quelli dei roditori. Anche per questi motivi i modelli sperimentali murini non dovrebbero essere considerati più adatti di altri.

Per quanto riguarda gli altri risultati ottenuti nella nostra ricerca sono in linea con quelli effettuati su altre specie, infatti quasi tutti i neuroni SP-IR co-esprimevano anche CGRP-IR; un alta percentuale di neuroni nNOS-IR co-esprimeva CGRP e/o SP-IR (Zhang et al., 1993; Bergman et al., 1999; Hwang et al., 2005; Tan et al., 2008; Russo et al., 2010a, 2011) e diversamente dal topo (Zwick et al., 2002), nei neuroni gangliari di maiale, l'IB4 ha un alto grado di co-localizzazione con il CGRP, la SP e il TRPV1.

L'ampia co-localizzazione dei diversi marcatori studiati può essere spiegata, almeno in parte, ipotizzando un coinvolgimento nelle stesse funzioni di diversi corredi neurochimici. Tutti i marcatori utilizzati in questa ricerca, infatti, sono coinvolti nella nocicezione. Il TRPV1 è un canale cationico presente nei nervi sensitivi in grado di percepire il calore e la capsaicina, una proteina che gioca un ruolo importante nella trasduzione degli stimoli nocicettivi al midollo spinale (Caterina e Julius, 2001). Si ritiene che la SP e il CGRP agiscano in sinergia nella modulazione dei neuroni nocicettivi del corno dorsale del midollo spinale (Hanesch e Schaible, 1995). Per mezzo di analisi immunostochimiche ed elettrofisiologiche si è dimostrato che una porzione importante dei nocicettori non-peptidergici presenta anche il recettore TRPV1 (Tominaga et al., 1998; Breese et al., 2005), così come si è anche dimostrato che neuroni sensitivi nocicettivi TRPV1-IR del topo (Zwick et al., 2002) e del maiale (Pereira et al., 2010; presente ricerca) avevano anche un corredo neuropeptidico.

In diversi studi si ipotizza che l'ossido nitrico sia coinvolto nella nocicezione viscerale nel topo (Larson et al., 2000); nella stessa specie è stato mostrato che la maggior parte dei neuroni afferenti primari TRPV1-IR che innervano il digiuno co-esprimevano non solo nNOS-IR ma anche SP-IR e CGRP-IR (Tan et al., 2008). In questo studio si è osservata una ampia co-localizzazione tra TRPV1 e nNOS, a conferma dell'ipotesi di un ruolo nei percorsi nocicettivi dell'ossido nitrico, anche del maiale. Anche nei neuroni dei gangli spinali toraco-lombari del ratto circa il 75% dei neuroni IB4 positivi erano TRPV1-

IR (osservazione personale R. Chiocchetti). Nel maiale Obreja et al., (2008) hanno dimostrato che la maggior parte dei neuroni dei gangli spinali toraco-lombari in coltura erano anche loro IB4-positivi e TRPV1-IR; questi dati sono coerenti con quelli ottenuti nella presente ricerca sulle criosezioni di gangli spinali di maiale.

Il *pattern* delle terminazioni nervose dei neuroni dei gangli spinali IB4 positivi nel midollo spinale è intimamente correlato a quello dei nocicettori cutanei (Light e Perl, 1979; Kitchener et al., 1994) e viscerali (Burnstock, 2000; Aoki et al., 2005). Recentemente Shehab e Hughes (2011) hanno dimostrato la presenza di IB4 della maggior parte delle fibre afferenti non mielizzate del nervo sciatico del ratto.

I processi periferici dei neuroni sensitivi dei gangli spinali TRPV1-IR differiscono nel corredo neurochimico a seconda del loro *target* di distribuzione e la specie considerata. Nel ratto le fibre sensitive TRPV1-IR destinate alla vescica urinaria e alla pelle mostrano un contenuto neuropeptidico simile (CGRP e SP al 60% circa). Al contrario, le fibre TRPV1-IR destinate alla vescica e alla pelle mostrano differenti livelli di marcatura IB4, rispettivamente il 24% e il 58% (Hwang et al., 2005). Curiosamente, nel topo, la maggior parte delle fibre sensitive cutanee IB4 positive sono insensibili alla capsaicina, quindi TRPV1-negative (Molliver et al., 2011).

### ***Marcatura nel midollo spinale***

In un recente studio del gruppo di ricerca a cui appartengo, è stato dimostrato che i processi centripeti dei neuroni sensitivi dei gangli spinali di cavallo positivi per l'IB4 e immunoreattivi per CGRP e SP terminano nelle stesse aree del midollo spinale. I dati ottenuti dalla presente ricerca inerenti la distribuzione dei neuropeptidi nelle lamina I e II, e parzialmente nella lamina III, sono in accordo con i dati ottenuti nel maiale e nel cavallo (Merighi et al., 1990; Russo et al., 2011a), nel gatto (Hökfelt et al., 1975), nel ratto, nel pollo (Rössler et al., 1993) e nella scimmia (Ralston e Ralston, 1979), ma in contrasto con i dati forniti nel ratto da Guo et al. (1999), dove le fibre SP-IR, CGRP-IR e IB4-positive erano sono confinate nelle prime due lamine. Come osservato nel maiale, le fibre IB4-positive erano più concentrate nella lamina II, come riscontrato nel ratto (Guo et al., 1999),

Per quanto riguarda la distribuzione dei neuroni e delle fibre nNOS-IR, i nostri dati sono in accordo con quelli ottenuti nel criceto e nel ratto, in cui neuroni e fibre nNOS-

IR sono stati osservati nelle lamine I-III e nelle regioni sede dei neuroni viscerali pregangliari (Reuss e Reuss, 2001). Normalmente la nNOS-IR è espressa dai neuroni pregangliari simpatici e parasimpatici in diverse specie (Dunn et al. 1993), nel presente studio sono stati osservati solo neuroni pre-gangliari simpatici nNOS-IR, situazione descritta anche in altre specie, come il gatto (Vizzard et al., 1994) e la cavia (Doone et al., 1999).

Il TRPV1-IR nel midollo spinale è stato osservato nelle lamine I-II, con una più grande concentrazione di fibre nella parte interna della lamina II del ratto (Guo et al. 1999). Hwang e Valtschanoff (2003) hanno dimostrato, sempre nel ratto, che alcune fibre TRPV1-IR sono osservabili anche nelle lamine III-V, lungo il margine mediale del corno dorsale orientate verso la lamina X e lungo il margine laterale, orientate verso il nucleo parasimpatico sacrale.

Sfortunatamente non è possibile comparare i nostri dati con quelli disponibili in letteratura, perché le fibre TRPV1-IR non erano identificabili nel midollo spinale di suino.

Per quanto riguarda l'informazione sensitiva dal tratto urinario inferiore, i percorsi afferenti, pelvico e lombare, nocicettivo e non-nocicettivo, dalla vescica urinaria sono noti proiettarsi verso le stesse regioni del corno dorsale, cioè verso le lamine I, II, V-VII e X (Morgan et al. 1981; Birder e de Groat, 1992); anche questi dati sono coerenti con quelli prodotti da questo studio.

### **Marcatura con tracciante**

La maggioranza dei neuroni FB-positivi è stata trovata in due coppie di gangli spinali lombari e in tre coppie di sacrali. Il *pattern* sensitivo dal trigono vescicale, che è simile a quello proveniente dai vasi deferenti (Kaleczyc et al., 2002) e dall'utero (Wasowicz et al., 1998) di maiale. E' probabilmente correlato al modo in cui le fibre nervose afferenti raggiungono la vescica. Nel maiale, il nervo pelvico origina dal terzo (e a volte anche dal secondo) nervo spinale sacrale (Tsaknakis, 1971). I neuroni sensitivi del trigono localizzati nei gangli L4-L5 probabilmente inviano i loro processi periferici nel nervo ipogastrico. Vale la pena sottolineare che la presenza, per quanto scarsa, di altri neuroni sensitivi dell'UBT sparsi lungo i diversi gangli spinali da L2 a Ca1 indica che l'informazione sensitiva dell'UBT può raggiungere un più ampio tratto del midollo spinale, indipendentemente dal nervo in cui scorre.

La maggior parte degli studi sull'innervazione sensitiva della vescica ha utilizzato come modello sperimentale i piccoli roditori (Applebaum et al. 1980; Sharkey et al., 1983; Keast e de Groat, 1992; Vera e Nadelhaft, 1992; Bennett et al., 1996; Yoshimura et al., 1996; Zhou e Ling, 1997; Callsen-Cencic e Mense, 1997; Wang et al., 1998; Vizzard, 2001; Nandigama et al., 2010; Chen et al., 2010) e il gatto (Applebaum et al. 1980; Downie et al. 1984), mentre soltanto di recente sono stati riportati dati sull'uomo (Fowler et al., 2008; de Groat e Yoshimura, 2009). I nuovi studi eseguiti sul maiale evidenziano come questa specie possa essere un valido modello sperimentale per la comparazione con l'uomo nello studio del tratto urinario inferiore, così che alcuni ricercatori stanno indirizzando i loro studi in questa direzione (Conzen e Sollmann, 1982; Crowe e Burnstock, 1989; Jezernik et al. 2000); comunque, solo Bossowska et al. (2009) si sono concentrati sui percorsi sensitivi della vescica di scrofa, iniettando la parete laterale destra. Da studi sui roditori, sui gatti e sull'uomo è evidente che, in specie differenti, si trovano diversi percorsi sensitivi dalla vescica che coinvolgono settori diversi dei gangli spinali. Solo nell'uomo e nei piccoli roditori i ricercatori hanno trovato neuroni sensitivi della vescica localizzati al livello dei gangli toracici caudali, mentre soltanto nel maiale questi neuroni erano localizzati nel primo ganglio coccigeo (Bossowska et al. 2009; presente ricerca).

In questo studio i neuroni marcati FB sono localizzati in tutti i gangli da L2 a Ca1, anche se la maggior parte dei neuroni marcati era concentrata nei gangli L4-L5 e S2-S4; Bossowska et al. (2009) hanno osservato grandi quantità di cellule marcate FB non solo nei DRG S3-S4 ma anche Ca1 di maiali, mentre nella nostra osservazione soltanto poche cellule sono state identificate. Al contrario essi non hanno osservato neuroni FB-marcati nei DRG L7 e S1-S2. I nostri dati sull'UBT di maiale, presi insieme a quelli forniti da Bossowska et al. (2009) sull'innervazione sensitiva del lato destro dell'UB di scrofa, forniscono una buona rappresentazione della localizzazione della totalità dei neuroni dei DRG sensitivi dell'UB di maiale in entrambi i sessi. Questi risultati anatomici confermano ciò che era stato sospettato tre decenni fa dai chirurghi sperimentali Conzen e Sollmann (1982), che hanno notato che alcuni impulsi afferenti del riflesso della minzione possono raggiungere il midollo spinale suino non solo attraverso il nervo pelvico ma anche attraverso il nervo ipogastrico. I risultati dagli studi sull'UB e sull'UBT del maiale possono essere utili ai fisiologi e ai chirurghi sperimentali per poter eseguire idonei

esperimenti sui percorsi sensitivi del tratto urinario inferiore del maiale (Jezernic et al. 2000).

### ***Dimensione dei neuroni DRG FB-marcati***

Bossowska e Colleghi (2009) hanno trovato che i neuroni sensitivi innervanti il lato destro della vescica urinaria di maiale erano di piccole (60%) e medie (40%) dimensioni, mentre solo pochissime cellule erano grandi. I nostri risultati sono coerenti con questi dati; infatti noi abbiamo osservato che circa il 54% dei neuroni destinati al trigono vescicale erano piccoli, il 42% erano di medie dimensioni e solo il 3% dei neuroni erano grandi. Vale la pena sottolineare che gli animali da noi presi in considerazione avevano un peso corporeo maggiore di quello dei soggetti utilizzati da Bossowska et al. (2009) (30-40 Kg vs. 15-20), cosa che può giustificare la più alta percentuale di neuroni grandi nel nostro studio.

In questo studio è stato inoltre osservato che li neuroni lombari erano significativamente più grandi dei neuroni sacrali. Per spiegare questo dato si possono considerare alcuni aspetti: 1) La prima ragione plausibile potrebbe essere la più ampia distribuzione periferica delle fibre nervose sensitive lombari. 2) Un'altra possibile spiegazione potrebbe anche essere che alcuni neuroni lombari possono avere processi dicotomizzanti, cioè presentare processi divergenti destinati a due territori differenti, come ad esempio l'apparato digerente e la cute, come già dimostrato nei piccoli roditori da Christianson et al. (2007) e Shibata et al. (2011). 3) Si dovrebbe anche considerare che le fibre sensitive attraversano i gangli prevertebrali del sistema nervoso simpatico; come già dimostrato nelle piccole specie di laboratorio e recentemente anche nel cavallo (Russo et al., 2010b), queste fibre sensitive (lombari) possono inviare numerose collaterali destinate al reclutamento dei neuroni dei gangli prevertebrali simpatici. Perciò, anche questa funzione potrebbe essere giustificata da una dimensione maggiore del pirenoforo dei neuroni sensitivi. 4) Si dovrebbe considerare il territorio di distribuzione del processo centripeto dei neuroni sensitivi all'interno della sostanza grigia del midollo spinale; più questo è ampio e più il neurone sensitivo presenta dimensioni maggiori. 5) Non da ultimo si dovrebbero considerare le proprietà elettrofisiologie dei neuroni sensitivi; infatti, è stata dimostrata (Yoshida e Matsuda, 1979) una relazione lineare tra il diametro della fibra nervosa e la sua velocità di conduzione. La velocità di conduzione delle fibre sensitive

dell'UB può differire da specie a specie, ma anche all'interno della stessa specie, come dimostrato da Vera e Nadelhaft (1990). Ad oggi comunque non vi sono studi in merito nella specie suina. Nel gatto è stato dimostrato che i neuroni sensitivi vescicali che inviano le loro fibre attraverso il nervo ipogastrico sono più grandi di quelli che utilizzano il nervo pelvico (de Groat, 1986). Sebbene i neuroni afferenti del nervo ipogastrico siano in numero minore di quelli pelvici, essi risiedono in un numero più grande di DRG (da L2 a L7), ed è degno di nota che la distribuzione centrale delle proiezioni afferenti ipogastriche sia più ampia delle proiezioni centrali delle fibre sensitive pelviche dell'UB (de Groat, 1986). I nostri dati sono coerenti con quelli ottenuti da Dang et al. (2005) nel ratto, i quali hanno mostrato che le fibre sensitive vescicali che scorrono nei nervi splanchnici lombari appartengono a neuroni che sono significativamente più grandi di quelli sacrali.

Sebbene non sia stato dimostrato elettrofisiologicamente, noi potremmo presumere che i neuroni sensitivi lombari destinati al trigono possano avere un diverso ruolo rispetto a quelli sacrali, ipotesi confermata anche dal differente corredo neurochimico (vedi in seguito).

La dimensione dei neuroni sensitivi sacrali dell'UBT suino è simile a quella trovata in specie più piccole, quali il ratto e il gatto (Applebaum et al. 1980; Bennett et al., 1996; Callsen-Cencic e Mense, 1997).

E' noto che i neuroni afferenti vescicali esibiscono cambiamenti neurochimici e morfometrici in corso di lesione spinale (Yoshimura et al. 1998; Vizzard, 2006). I dati morfometrici ottenuti in questa ricerca (su soggetti sani) potranno eventualmente rappresentare un punto di riferimento per la valutazione comparativa dei neuroni sensitivi vescicali analizzati in soggetti con lesioni spinali.

### ***Fenotipo dei neuroni sensitivi destinati al trigono vescicale***

Studi immunoistochimici e con traccianti hanno rivelato che numerosi peptidi, inclusi SP e CGRP, sono localizzati, singolarmente o in combinazione, nelle vie afferenti della vescica e sono anche potenziali mediatori dell'infiammazione (Chapple et al. 1992; Lasanen et al., 1992; Smet et al., 1997; Callsen-Cencic e Mense, 1997; Uckert et al., 2002; Andersson, 2002; de Groat e Yoshimura, 2009). Cambiamenti nell'espressione dei neuropeptidi sono stati osservati insieme a iperattività della vescica (Chapple et al. 1992;

Lasanen et al., 1992; Smet et al., 1997) e in modelli animali di infiammazione della vescica (Callsen-Cencic e Mense, 1997; Luber-Narod et al., 1997; Vizzard, 2000a, 2001; Zvarova e Vizzard, 2006; Arms e Vizzard, 2011). In particolare, le fibre afferenti più sensibili del muscolo detrusore (tensocettori in serie), stimulate da un aumento fisiologico del volume di urina e da contrazioni del muscolo detrusore, sono fibre sottili mieliniche (A- $\delta$ ) a bassa soglia di eccitazione che si ritiene utilizzino piccole quantità di neuropeptidi (Birder et al., 2010). Al contrario, le fibre C (amieliniche), distribuite per lo più nell'urotelio e nella lamina propria, contengono i neuropeptidi SP e CGRP (Radziszewski et al. 2009). Quindi, è possibile ipotizzare che i neuroni sensitivi sacrali destinati all'innervazione del trigono di maiale abbiano prevalentemente funzione propriocettiva, mentre quelli lombari abbiano principalmente funzione nocicettiva.

Per formulare questa ipotesi, abbiamo comparato il fenotipo dei neuroni gangliari di suino con quello dei neuroni del nucleo mesencefalico del trigemino, che veicolano informazioni propriocettive provenienti dai fusi neuromuscolari dei muscoli masticatori (hanno perciò una funzione esclusivamente propriocettiva). Nessuno dei neuroni di questo nucleo ha espresso immunoreattività ai marcatori utilizzati sui gangli spinali, indicando che i neuroni lombari e sacrali FB positivi, a corredo peptidergico, e marcati con IB4 non sono probabilmente propriocettori.

Dovremmo invece considerare che, sebbene alte percentuali di neuroni lombari FB-positivi esprimessero CGRP- e SP-IR, erano presenti alte percentuali di neuroni che non esprimevano un corredo peptidergico. Questo risultato è coerente con i dati ottenuti da Su et al. (1986), Keast e de Groat (1992), Bennett et al. (1996, 2003), Vizzard (2001), Yoshimura et al. (2003), i quali hanno riportato percentuali rilevanti (fino al 40%) di neuroni sensitivi della vescica non peptidergici. È probabile che tra questi neuroni FB-positivi si annoverino neuroni sensitivi propriocettivi.

Vale inoltre la pena notare che i neuroni lombari FB-marcati hanno mostrato una maggiore immunoreattività ai neuropeptidi CGRP e SP rispetto ai sacrali. A supporto dei nostri dati ci sono anche i risultati di Keast e de Groat (1992) nel ratto e di Bossowska et al. (2009) nel maiale, che indicano una più alta espressione di CGRP-IR a livello lombare rispetto al sacrale; al contrario Keast e de Groat (1992) hanno osservato una più alta espressione di SP-IR nei neuroni sacrali. È plausibile che nel maiale le vie afferenti lombari e sacrali possano giocare un ruolo differente nella trasmissione sensitiva

dall'UBT, come suggerito anche dalla diversa morfometria di questi neuroni. Langley (1903) è stato il primo a sostenere che la maggior parte delle fibre nocicettive afferenti destinate ad un viscere (cuore) siano veicolate dalle vie simpatiche e non da quelle parasimpatiche (nervo vago), mentre Lewis (1942) è stato il primo ad osservare che il dolore viscerale addominale sembra essere mediato quasi interamente dalle fibre afferenti simpatiche. Più di recente, è stato mostrato che la maggior parte delle fibre ipogastriche di gatto sono fibre C (Nadelhaft e Vera, 1991; Yoshimura et al. 1998) e che queste trasportino informazione nocicettive (Evans, 1936; Vera e Nadelhaft, 1992). I neuroni nocicettivi, che contengono grandi quantità di neuropeptidi (SP e CGRP) sono di dimensioni piccole o medie (Harper e Lawson, 1985); sebbene i neuroni lombari sensitivi dell'UBT fossero più grandi dei neuroni sacrali, entrambe le popolazioni neuronali osservate nel presente studio sono di dimensioni piccole o medie (vedi sopra). Ciononostante, è abbastanza peculiare che i neuroni sensitivi lombari, più grandi di quelli sacrali, abbiano mostrato una più alta percentuale di neuropeptidi.

I nostri dati concernenti il fenotipo neuronale sensitivo dell'UBT differiscono da quelli ottenuti da Bossowska et al. (2009). Questo non è sorprendente, dato che porzioni differenti dell'UB ricevono una differente innervazione afferente (e efferente) (Uemura et al, 1975; Vera e Nadelhaft, 1992). I nostri dati mostrano che i neuroni sensitivi destinati al trigono esprimono più immunoreattività al CGRP e al nNOS rispetto ai neuroni destinati al lato destro del corpo della vescica (Bossowska et al, 2009). Questo risultato supporta l'osservazione di Persson et al. (1995), relativa alla presenza di fibre CGRP- e nNOS-IR distribuite per lo più nel trigono di suino.

I nostri dati potrebbero essere supportati dal fatto che le fibre nNOS-IR agiscono sul collo della vescica attraverso il rilassamento della muscolatura liscia (Persson e Andersson, 1992).

Il fenotipo, la morfometria e le caratteristiche fisiologiche delle fibre afferenti vescicali sono probabilmente alla base del loro alto grado di plasticità dimostrato in seguito a danno spinale; infatti, in seguito ad un danno spinale, la vescica si presenta in principio in una fase di ariflessia, di “stasi”, mentre in una seconda fase è in grado di ripristinare riflessi atti alla minzione grazie all’insorgenza di un riflesso spinale. I cambiamenti neurochimici nei neuroni afferenti della vescica in seguito a danno del midollo spinale possono essere spiegati dai livelli alterati (aumentati) dei fattori neurotrofici nella vescica urinaria o nel

midollo spinale (Vizzard, 2000b). Infatti è stato mostrato che un eccesso di fattore di crescita neuronale all'interno dei gangli spinali può indurre una aumentata produzione di neuropeptidi quali SP o CGRP (Gary e Hargreaves, 1992). Per esempio, i neuroni sensitivi dell'UB possono alterare i loro livelli di proteina nNOS o del RNA messaggero dell'nNOS dopo danno al nervo pelvico (Vizzard et al. 1995) o a causa di irritazione cronica della vescica (Vizzard e de Groat, 1996; Vizzard, 1997). Sebbene il ruolo funzionale dell'NO nel normale riflesso di minzione sia incerto e la nNOS-IR non sia espressa in condizioni fisiologiche nel ratto (Vizzard e de Groat, 1996), l'NO sembra essere coinvolto a livello spinale nella facilitazione del riflesso di minzione da parte di afferenze nocicettive della vescica (Rice, 1995; Kakizaki e de Groat, 1996).

I nocicettori sono eterogenei rispetto agli stimoli adeguati, e, dopo danno al nervo o al tessuto, sottogruppi di nocicettori rispondono con cambiamenti diversi nel loro fenotipo. Fibre nocicettive insensibili agli stimoli meccanici nell'uomo (nocicettori "silenziosi"), non rispondono a stimoli meccanici in soggetti sani, ma possono diventare maccanocettori in condizioni di infiammazione, come i nocicettori polimodali (McMahon e Koltzenburg, 1990; Handwerker et al. 1991). Il recupero della funzione vescicale in seguito a danno al midollo spinale dipende in parte dallo smascheramento dei riflessi innescato da fibre amieliniche (sensibili alla capsaicina) (de Groat e Yashimura, 2009).

Ci sono pochissimi studi nei quali l'immunoreattività al NF200 è stata valutata nei neuroni sensitivi dell'UB (Yoshimura et al. 1998, 2003; Hayashi et al. 2009). Circa il 60% dei neuroni lombari e sacrali mercati FB di suino erano NF200-IR. Questo risultato è in contrasto con i dati ottenuti nel ratto, in cui un terzo dei neuroni afferenti della vescica era NF200-IR (Yoshimura et al. 1998); ciononostante, vale la pena notare che questa percentuale potrebbe aumentare fino al 62% in seguito a un danno al midollo spinale (Yoshimura et al., 1998). Nel ratto, risultati recenti mostrano che un numero considerevole (circa 83%) di neuroni afferenti della vescica esprimenti *transient receptor potential melastatin-8* (TRPM-8) sensibili al freddo sono anche NF200-IR. È interessante notare che questi neuroni TRPM-8-IR co-esprimevano ampiamente marcatori nocicettivi, quali CGRP e TRPV1. Le fibre NF200-IR, ritenute essere fibre A-delta (Lawson e Waddell, 1991) possono essere coinvolti nel riflesso di raffreddamento (cooling reflex) vescicale del ratto.

In teoria, una grande parte di neuroni NF200-IR di suino potrebbe essere costituita da nocicettori - principalmente neuroni A-delta ma anche A-beta (Djouhri e Lawson, 2004); a favore di questa supposizione c'è anche la nostra osservazione che i neuroni sensitivi per il trigono vescicale erano sia NF200- che SP-IR, con quest'ultimo considerato un tipico marcatore della nocicezione.

Nel ratto circa il 69% dei neuroni sensitivi dell'UB era TRPV1-IR (Hwang et al., 2005).

I nostri dati hanno dimostrato che i neuroni nocicettivi TRPV1-IR sono più rappresentati nei gangli lombari; questo può suggerire che anche nel maiale, nervi sensitivi ipogastrici possono essere coinvolti nella trasmissione nocicettiva in caso di iperdistensione della vescica e nell'infiammazione vescicale (Mitsui et al., 2001).

### ***Co-espressione dei markers neurochimici nei neuroni sensitivi destinati al trigono vescicale***

L'interpretazione dello studio di co-localizzazione dei neuroni FB-positivi non è semplice. Infatti, è stato osservato che i neuroni marcati con IB4, che nel topo identificano neuroni non-peptidergici, erano invece ampiamente SP- e CGRP-IR nel maiale. Inoltre, l'immunoreattività alla SP, che dovrebbe essere presente principalmente nei piccoli neuroni nocicettivi amielinici, era largamente co-espressa insieme alla immunoreattività per il NF200 (quest'ultima dovrebbe invece identificare i neuroni mielinici).

Sebbene grandi percentuali di neuroni FB-marcati mostrassero TRPV1-, SP-, o nNOS-IR, in seguito a studi di doppia co-localizzazione (FB/TRPV1/SP, FB/TRPV1/nNOS), sono state osservate modeste percentuali di neuroni nocicettivi immunoreattive per la SP o il nNOS; inoltre, una buona percentuale di neuroni lombari (non quelli sacrali) TRPV1-IR co-esprimevano SP-IR. Il fatto che la maggioranza dei neuroni nocicettivi SP- e/o nNOS-negativi potrebbe far supporre la presenza di due sottopopolazioni funzionalmente distinte di neuroni nocicettivi: una grande popolazione di neuroni TRPV1-IR (esprime altri neuropeptidi non studiati in questa ricerca), e una più piccola sottoclasse di neuroni esprimenti SP- e nNOS-IR. Al contrario, è anche evidente che alcuni neuroni peptidergici FB-marcati possono essere coinvolti in percorsi sensitivi non nocicettivi.

Questi risultati confermano le ampie differenze biologiche interspecifiche e suggeriscono la necessità di uno studio più completo nel suino per poter identificare gli altri neurotrasmettitori/neuromodulatori utilizzati dalle vie sensitive vescicali.

### **Ringraziamenti**

Gli autori ringraziano la Dott.ssa Chiara Bernardini per la preziosa analisi della specificità degli anticorpi primari con la tecnica del Western blot.

# Fase 3

## **Localizzazione dei neuroni del sistema nervoso vegetativo destinati all'innervazione del trigono vescicale di maiale e caratterizzazione neurochimica della componente simpatica**

Ragionieri L1, Botti M, Gazza F, Sorteni C, Chiocchetti R, Clavenzani P, Minelli LB, Panu R.

**Localization of peripheral autonomic neurons innervating the boar urinary bladder trigone and neurochemical features of the sympathetic component.**

Eur J Histochem. 2013 May 6; 57 (2):e16.

### **Riassunto**

Il trigono della vescica urinaria (UBT) è una area delimitata della vescica urinaria, dove penetrano la maggior parte dei vasi e delle fibre nervose, e dove è osservabile il maggior numero di fibre nervose e di neuroni intramurali. Nel presente studio è stata localizzata la sede dei neuroni simpatici post-gangliari (extra-vescicali) destinati al trigono vescicale di maiale utilizzando il tracciante a trasporto retrogrado (Fast Blue, FB). Inoltre, è stato studiato il fenotipo dei neuroni dei gangli del tronco simpatico (STG, *sympathetic trunk ganglia*) e del ganglio mesenterico caudale (CMG, *caudal mesenteric ganglion*) FB-positivi (FB+) utilizzando tecniche di immunofluorescenza. Nei gangli del tronco simpatico compresi tra L1 e S3 sono stati contati  $1845 \pm 259$  neuroni FB+; questi erano distribuiti bilateralmente, occupavano una posizione generalmente periferica ed erano di piccole dimensioni ( $465,6 \pm 82,7 \mu\text{m}^2$ ).

Nei gangli mesenterici caudali sono stati osservati  $4287,5 \pm 1450,6$  piccoli ( $476,1 \pm 103,9 \mu\text{m}^2$ ) neuroni FB+ distribuiti principalmente lungo un loro margine.

Nel plesso pelvico (PP) il numero di neuroni FB+ era di  $4793,3 \pm 1990,8$ ; queste cellule, di piccole dimensioni ( $374,9 \pm 85,4 \mu\text{m}^2$ ) erano organizzate in micro-gangli.

Il  $66 \pm 10\%$  dei neuroni FB+ della catena simpatica (STG) erano immunoreattivi (IR) alla tirosina idrossilasi (TH-IR) mentre quelli del ganglio mesenterico caudale erano il  $53 \pm 8\%$ ; Per quanto riguarda la loro positività alla dopamina beta-idrossilasi (D $\beta$ H-IR) era positivo il  $62 \pm 6\%$  dei neuroni della STG e il  $52 \pm 6\%$  dei neuroni del GMC. Il neuropeptide Y (NPY) era espresso dal  $59 \pm 8,2\%$  dei neuroni della STG e il  $65,8 \pm 7,3\%$  dei neuroni del CMG.

Il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) era espresso dal  $24,1 \pm 3,3\%$  dai neuroni della catena simpatica e dal  $22,1 \pm 3,3\%$  dei neuroni del GMC. La sostanza P (SP) era espressa dal  $21,6 \pm 2,4\%$  dai neuroni della catena simpatica e dal  $37,7 \pm 7,5\%$  dei neuroni del GMC. Il polipeptide intestinale vasoattivo (VIP) era espresso dal  $19 \pm 2,3\%$  dei neuroni della catena simpatica e dal  $35,4 \pm 4,4\%$  dei neuroni del GMC. Per quanto riguarda l'enzima sintetizzante l'ossido nitrico (ossido nitrico sintasi neuronale, nNOS) questo era espresso dal  $15,3 \pm 2\%$  dei neuroni della catena simpatica e dal  $32,9 \pm 7,7\%$  dei neuroni del GMC. Il trasportatore vescicolare di acetilcolina (VACHT) era contenuto nel  $15 \pm 2\%$  dei neuroni della catena simpatica e nel  $34,7 \pm 4,5\%$  dei neuroni del GMC. La leu-enkefalina (LENK) era contenuta per il  $14,3 \pm 7,1\%$  nei pirenofori della STG e per il  $25,9 \pm 8,9\%$  nei pirenofori del GMC. Per quanto riguarda la somatostatina (SOM), questa era espressa dal  $12,4 \pm 3\%$  dei neuroni della catena simpatica e dal  $31,8 \pm 7,3\%$  dei neuroni del CMG. Infine, i neuroni destinati al trigono vescicale erano circondati da fibre VACHT-, CGRP-, LENK-, e nNOS-IR. In questo studio si è ipotizzato il ruolo di questi neuroni e di queste fibre nei circuiti neuronali destinati al trigono.

## **Introduzione**

La vescica urinaria (UB) immagazzina e periodicamente rilascia l'urina sotto il controllo di circuiti neuronali al livello encefalico, nel midollo spinale e nei gangli periferici. Il sito in cui il maggior numero delle fibre nervose e dei vasi penetra nella vescica (Fowler et al. 2008; Birder L et al. 2010) e dove le fibre nervose intramurali sono più concentrate (Andersson, 2002; Pidsudko, 2004) è il trigono della vescica urinaria (UBT). L'area trigonale è una regione triangolare situata dorsalmente nel corpo della vescica, delimitata dagli orifizi ureterici e da quello uretrale, completamente rivestita da

un epitelio la cui origine mesodermica è stata recentemente messa in discussione (McGaedy et al 2006) a favore di una origine endodermica Tanaka et al 2010). Recenti studi suggeriscono che la sua componente muscolare del trigono derivi prevalentemente dal muscolo vescicale e che il contributo delle fibre longitudinali ureteriche sia limitato (Viana, 2007).

Visto l'ampliarsi delle informazioni, negli ultimi decenni, inerenti il trigono si è arrivati a considerare l'UBT come una entità funzionale capace di controllare la fuoriuscita dell'urina e di fornire un meccanismo antireflusso dell'urina negli ureteri (Tanagho, 1982). Ne consegue che di conseguenza, il trigono gioca un ruolo essenziale nel mantenimento della continenza e nel supporto alla minzione.

Sia in medicina veterinaria (Wilson et al 2010; Saulnier-Troff et al 2008) che in medicina umana (Shokeir, 2004) è un sito elettivo per lo sviluppo di proliferazioni tumorali. Quindi, noi crediamo che una migliore conoscenza delle vie nervose coinvolte nella regolazione della minzione sia utile per comprendere i meccanismi implicati nel controllo dell'accumulo e dello svuotamento vescicale in condizioni fisiologiche e patologiche. Maggiori informazioni possono fornire una più esauriente comprensione del meccanismo di azione delle terapie mediche già esistenti e una base per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il mantenimento o il recupero di un corretto funzionamento appropriato della vescica.

Ad oggi, nel maiale, sono stati identificati e studiati i neuroni sensitivi (Bossowska et al. 2009) destinati alla vescica, i neuroni intramurali del trigono vescicale (Pidsudko, 2004) o nella parte pelvica dell'uretra e nel collo della vescica (Sienkiewicz et al. 2004). E' stato quindi intrapreso questo studio, combinando tecniche che abbinano traccianti fluorescenti a trasporto retrogrado e tecniche immunoistochimiche per fornire una descrizione dettagliata della distribuzione, della morfologia e del corredo neuropeptidico dei neuroni del sistema nervoso autonomo (SNA) destinati all'UBT del maiale. Alcuni dati riguardanti i neuroni sensitivi del maiale sono già stati pubblicati (Russo et al. 2010). Nel presente lavoro verranno descritte la distribuzione e la morfologia dei neuroni del SNA extramurali e il corredo neuropeptidico dei neuroni simpatici destinati all'UBT di maiale.

Il maiale, contrariamente agli animali più piccoli come ratti e gatti, ha il vantaggio di presentare conformazione anatomica, dimensioni e funzionalità del sistema urinario

simili a quello dell'uomo (Wen et al. 1999; Dalmoose et al., 2000) e rappresenta quindi un modello sperimentale animale estremamente adatto.

## **Materiali e metodi**

Tutte le procedure descritte in seguito sono state eseguite in accordo con *L'European Communities Council Directive* del 24 novembre 1986 (86/609/EEC) e con la legislazione italiana riguardante gli animali sperimentali, dopo l'approvazione da parte *Scientific Ethics Committee for Experiments on Animals of the University of Parma* (Prot. Rif. 68/09). Sono stati compiuti tutti i possibili sforzi per minimizzare il numero degli animali usati e la loro sofferenza.

Quattro maiali maschi interi ottenuti dall'incrocio delle razze *Large white x Landrace x Duroc* (peso medio: 34±3 Kg, intervallo 30-38 Kg) sono stati alimentati con una dieta ad libitum per una settimana prima dell'esperimento. Gli animali sono stati sottoposti a digiuno per 24 ore prima dell'intervento chirurgico. La profilassi antibiotica pre-operatoria è stata eseguita con ceftiofur sodium (Naxcel, 5 mg/Kg i.m., Pfizer, Sandwich Kent, UK). Gli animali sono stati sedati con azaperone (4-10 mg/10Kg; Stresnil, Janssen Cilag, Cologno Monzese, Italy) e ketamina (150 mg/10Kg; Ketavet 100, Intervet Italia, Aprilia, Italy) somministrati per via intramuscolare. Dopo il decubito e la cateterizzazione venosa (*vena auricularis lateralis*) l'anestesia è stata indotta attraverso la somministrazione di propofol (2-6 mg/Kg i.v.; Rapinovet, Schering Plough, Segrate, Italy) e mantenuta con isofluorano 1,5-2% in 100% di ossigeno distribuito da un circuito aperto attraverso un tubo orotracheale cuffiato Magill. La profilassi post-operatoria è stata eseguita per 5 giorni dopo l'intervento, con tolfedine (2 mg/Kg; Vetoquinol, Magny-Vernois, Lure Cedex, France) per l'effetto anti-infiammatorio e buprenorphine (10 mg/kg i.m.; Temgesicl, Schering Plough, Segrate, Italy) per garantire l'analgesia.

I maiali sono stati posizionati sul tavolo operatorio in decubito dorsale, la pulizia del campo operatorio è stata eseguita utilizzando betadine e alcool isopropilico. L'intervento di laparotomia è stato effettuato con una incisione post-ombelicale sulla linea alba lunga 10-12 cm. Una volta esposta la superficie dorsale della vescica, sono stati iniettati, per mezzo di una micro-siringa in vetro Hamilton da 10 µl, 50 µl di tracciante fluorescente a trasporto retrogrado Fast Blue (FB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany; soluzione acquosa al 2%) in 5 siti del trigono vescicale. Le iniezioni sono state

eseguite al centro dell'area trigonale e vicino alla giunzione di ciascun uretere con la vescica; i siti di iniezione erano facilmente individuabili per la presenza del colore giallo lasciato dal deposito del tracciante al di sotto della sierosa. Una esecuzione attenta e scrupolosa di questa fase della procedura è importante per evitare qualunque fuoriuscita del tracciante dai siti di iniezione. Dopo aver riposizionato correttamente i visceri in addome, questo è stato chiuso con una sutura di routine a tre strati. Il ricovero e il periodo post-operatorio sono stati privi di eventi significativi. Due settimane dopo la chirurgia, i maiali sono stati profondamente sedati ed anestetizzati e sottoposti ad eutanasia per somministrazione intravenosa di embutramide, mebenzonium iodide e tetracaine idrocloride (Tanax, Intervet, Italy; 0,3 ml/Kg). Gli animali usati in questo studio avevano 14 vertebre toraciche (T), sette lombari (L), 4 sacrali (S) e 20 caudali (Ca).

### **Specificità dei siti di iniezione**

Al fine di non creare ripetizioni ridondanti si rimanda la lettura di questo capitolo nel paragrafo Fase I-II

### **Preparazione del tessuto**

Da ogni soggetto sono stati raccolti, da entrambi i lati, i gangli del tronco simpatico (STG), i gangli mesenterici craniali e caudali (CrMG e CMG), il plesso pelvico (PP), il midollo spinale (MS; spinal cord SC) e i gangli spinali (GS; *dorsal root ganglia*, DRG). Il midollo spinale e i relativi gangli sono stati raccolti da Th11 a Ca2. Il PP è stato identificato e raccolto secondo le indicazioni fornite da Tsaknakis (Tsaknakis, 1971), Panu et al. (2003), e Sienkiewicz (2010). Tutti i campioni raccolti sono stati fissati per 6-8 ore in paraformaldeide al 4% in *buffer* fosfato (0,1M, pH 7,2) a 4°C, risciacquati *overnight* in PBS (PBS: 0,15M NaCl in 0,01M di *buffer* sodio fosfato, pH 7,2) e conservati a 4°C in PBS-saccarosio-azide. Il giorno seguente, i tessuti sono stati trasferiti in una soluzione di PBS-Saccarosio-Azide e *Killik cryostat embedding medium* (Bio-Optica, Milan, Italy) in rapporto 1:1 per altre 24 ore prima di essere posti nel medium di inclusione puro. I tessuti sono stati congelati utilizzando 2-metil-butano (isopentano) raffreddato in azoto liquido. Le criosezioni longitudinali seriate di tutti i gangli, di ambo i lati (16 µm di spessore), ottenute al criostato, sono state montate su vetrini gelatinizzati.

Il PP è stato diviso in parti più piccole e successivamente tagliato in sezioni seriate. Le sezioni seriate del midollo spinale sono state utilizzate per verificare la specificità del sito di iniezione. Le sezioni sono state montate su vetrini gelatinizzati (non chiusi con il vetrino copri-oggetto) ed esaminati con un microscopio fluorescente (Zeiss Axioskop 2 plus) le cui caratteristiche tecniche sono già state descritte nella fase I-II. I vetrini sono poi stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  sino all'utilizzo per le reazioni di IHC.

### **Analisi quantitativa**

Per valutare il numero dei neuroni FB+ si sono contate solo le cellule che avevano il nucleo riconoscibile. Per calcolare il numero totale dei neuroni FB+ si è utilizzata la di Abercrombie (vedi M&M Fase I-II); (Guillery, 2002) È stato calcolato il diametro medio dei nuclei di 100 neuroni FB+ della catena simpatica, del GMC e del PP. Il diametro medio dei nuclei dei neuroni della catena simpatica lombare e sacrale era di  $11\pm 1\mu\text{m}$  (fattore di correzione=0,57). Il diametro medio dei nuclei dei neuroni del CMG era di  $13\pm 1\mu\text{m}$  (fattore di correzione=0,52). Il diametro medio dei nuclei dei neuroni del PP era di  $10\pm 1\mu\text{m}$  (fattore di correzione=0,61).

Il numero totale di neuroni FB+ contati nei gangli (STG, CMG e PP) e la loro distribuzione nei vari settori sono stati presentati come media  $\pm$  errore standard della media (SEM). L'area dei pirenofori FB+ è stata misurata con ingrandimento 40x; le sezioni sono state fotografate con una fotocamera digitale Zeiss Axiocam MRc5. Per ogni ganglio sono state eseguite misurazioni manuali su un numero minimo di 200 cellule FB+ per mezzo del software AxioVision 4.5 (Carl Zeiss, MicroImagin GmbH, Germany).

I dati morfometrici relativi ad ogni classe neuronale sono stati comparati in ogni animale e tra gli animali con analisi della varianza one-way (ANOVA) seguita dal test *post-hoc* Tukey. Il livello statistico di significatività è stato posto a  $P < 0,05$ . Tutte le analisi sono state fatte con SPSS per Windows (v.18; SPSS Inc., Chicaco, IL, USA).

### **Immunoistochimica**

In questo studio abbiamo analizzato il corredo neurochimico dei gangli del tronco simpatico e sui gangli mesenterici caudali, che sono considerati tipici gangli simpatici, e non sui gangli del plesso pelvico che sono considerati gangli misti contenenti sia neuroni simpatici che parasimpatici.

Sui gangli della catena simpatica e sui gangli mesenterici caudali sono state eseguite reazioni di immunofluorescenza per valutare la presenza del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), della dopamina beta-idrossilasi (D $\beta$ H), della leu-encefalina (LENK), dell'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS), del neuropeptide Y (NPY), della somatostatina (SOM), della sostanza P (SP), della tirosina idrossilasi (TH), del trasportatore vescicolare di acetilcolina (VACHT) e del polipeptide intestinale vasoattivo (VIP) e la co-localizzazione della TH con gli altri *markers*.

Le sezioni si lasciano asciugare all'aria a temperatura ambiente (RT) per 30 minuti, successivamente è stata eseguita una pre-incubazione con una soluzione di Triton X-100 allo 0,25% con l'1% di albumina sierica bovina e il 10% siero normale di capra in PBS (0,15M NaCl in 0,01M di *buffer* sodio fosfato, pH 7,2) per 1 ora RT, per ridurre il *background*. Le sezioni sono successivamente incubate con una combinazione degli anticorpi primari *overnight* a RT (tabella 1) e dopo gli opportuni risciacqui incubate con una soluzione di isotiocianato di fluoresceina (FITC)-coniugata e l'anticorpo derivato dalla capra di IgG di topo biotilinata (1 h; RT). Infine, le sezioni vengono incubate con streptavidina *Texas Red* coniugata (1 h; RT) e montati con un *buffer* di glicerolo. Le sezioni sono state poi osservate e fotografate con un microscopio a fluorescenza Zeiss Axioskop 2 plus (equipaggiato come descritto nella fase I-II).

Le percentuali di neuroni, per ogni ganglio, che esprimevano le differenti combinazioni dei marcatori è stata calcolata sul totale dei neuroni FB+ destinati al trigono per ogni anticorpo utilizzato in questo studio. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM tra i quattro animali. Le proporzioni delle varie combinazioni dei marcatori nei diversi gangli sono state valutate con il test Chi-quadro. Un valore  $P < 0,05$  è stato considerato significativo. Tutte le analisi sono state fatte con SPSS per Windows (v.18; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **Caratterizzazione dell'anticorpo**

### ***Specificità degli anticorpi primari***

La specificità degli anticorpi anti-CGRP (Sigma-Aldrich) e anti-nNOS (Chemicon-Millipore) è stata testata recentemente per mezzo dell'analisi Western blot (WB) (Russo et al. 2013) su tessuti di maiale.

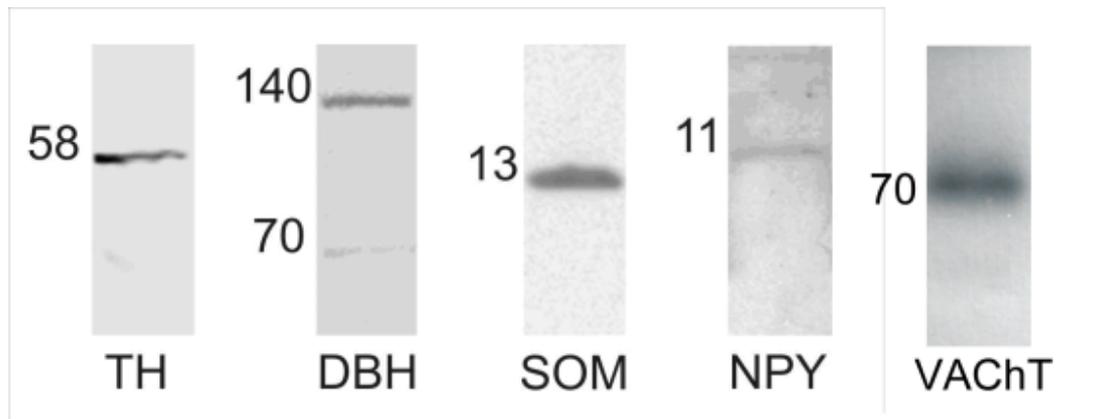
La specificità di anticorpi anti-TH (Sigma-Aldrich), anti-D $\beta$ H (Chemicon), anti-SOM (Genetex), anti-NPY (Sigma-Aldrich) e anti-VACHT (Sigma-Aldrich) è stata testata in questo studio per mezzo dell'analisi WB. Inoltre, gli anticorpi anti-VIP, anti-CGRP, -NPY, -TH e -VIP sono stati testati con il test di assorbimento. Si deve inoltre notare che i *datasheet* della Sigma-Aldrich garantiscono la specificità degli anticorpi primari anti-CGRP, -SP, -NPY e -VIP nei tessuti di maiale. L'anticorpo policlonale anti-LENK (Chemicon) non ha dato risultati nell'analisi WB, non si è potuto garantire la specificità dell'anticorpo, così come specificato dallo stesso produttore. Il LENK è un peptide oppioide che in tutti i Mammiferi deriva dallo stesso precursore (Noda et al. 1982), questo rende ragionevole credere che l'anti-LENK possa riconoscere il polipeptide del maiale.

### **Westen blotting**

I campioni di tessuto (DRG, STG e SC) sono stati raccolti, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. In seguito, per l'analisi delle proteine, i tessuti sono stati scongelati e omogeneizzati direttamente in una soluzione di lisi (SDS) (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2%, 5% glicerolo) con 0,1 mM di fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF). Il contenuto proteico dei lisati cellulari è stato determinato con il protocollo standardizzato *Protein Assay Kit* (TP0300, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Le aliquote contenenti 10  $\mu$ g di proteine sono stati fatti correre sul gel NuPage 4-12% bis-Tris Gel (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) per 50 minuti a 200V. Le proteine sono state successivamente trasferite elettroforeticamente su una membrana di nitrocellulosa. Le bande sono state lavate con PBS e il trasferimento proteico è stato controllato colorando le membrane di nitrocellulosa con Rosso di Ponceau al 2%. Le membrane sono state incubate a +4°C *overnight* con i rispettivi anticorpi in *buffer* Tris saline-T20 (TBS-T20 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,1% T-20); anticorpo monoclonale anti-TH derivato dal topo (1:1500 Sigma-Aldrich), anticorpo policlonale anti-SOM prodotto nel coniglio (1:2000 GeneTex), anticorpo policlonale anti-NPY derivato dal coniglio (1:3000 Sigma-Aldrich e Chemicon), anticorpo policlonale anti-D $\beta$ H prodotto nel coniglio (1:1000 Chemicon), anticorpo policlonale anti-VACHT derivato dal coniglio (1:500 Sigma-Aldrich), anticorpo policlonale anti-LENK prodotto nel coniglio (1:1000 Chemicon).

Dopo diversi lavaggi con PBS-T20, le membrane sono state incubate con anticorpo secondario coniugato con la biotina e successivamente con un anticorpo anti-biotina *horse-radish peroxidase* (HRP)-*linked* con diluizione 1:1.000.

Le bande del Western blot sono state sviluppate utilizzando un substrato chemiluminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) secondo il protocollo fornito dal produttore. L'intensità del segnale luminescente delle bande è stato rilevato con un Fluor-STM Multimager con il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). L'analisi delle bande ha confermato la specificità degli anticorpi primari utilizzati nel presente studio. La banda rivelata nel midollo spinale per mezzo dell'anticorpo anti-TH ha mostrato un peso molecolare approssimativo di 58 KDa (Figura 1) mentre nei gangli spinali la banda ha mostrato un peso molecolare inferiore, infatti era di 55 KDa (Figura 1); Poiché la sequenza proteica completa nei maiali non è disponibile (<http://www.uniprot.org>), abbiamo considerato il peso molecolare teorico di TH in *Homo sapiens* (58 KDa). In *Homo sapiens* sono note quattro isoforme della proteina, 55,6, 56, 58,1 e 58,5 KDa; non possiamo escludere che due isoforme specifiche di questa proteina possono esistere anche nel maiale. L'analisi WB per la proteina D $\beta$ H ha mostrato, nei gangli spinali e nel midollo spinale, una banda con peso molecolare approssimativo di 70 KDa; sebbene la sequenza del D $\beta$ H sembri essere conservata in specie differenti, come Mammiferi e Uccelli, nemmeno la sequenza completa del D $\beta$ H nel maiale è disponibile. Come è già stato osservato in altre specie (Fraeyman et al. 1988; Russo et al. 2009; Russo et al. 2010), anche in questo studio si sono osservate una isoforma monomerică e una dimerica di D $\beta$ H (Figura 1). La banda riferibile alla proteina somatostatina si è potuta rilevare nel midollo spinale di suino, ma non nei gangli spinali, con un peso approssimativo di 13 KDa (Figura 1), coerente con il peso del pre-pro-peptide. L'analisi WB per la proteina NPY, nel midollo spinale di suino, ha mostrato una banda del peso approssimativo di 11 KDa (Figura 1), coerente con la sequenza completa del pre-pro-peptide. Nei gangli spinali la banda era più debole (dati non mostrati) e con un peso molecolare differente (di circa 4,5 KDa), in linea con il risultato riportato da Kos et al. (2007). La banda per la proteina VAcHT ottenuta dai gangli della catena simpatica, esprimeva un peso approssimativo di 70 KDa (Figura 1), dato coerente con il peso molecolare della sequenza aminoacidica della proteina VAcHT.



**Fig. 1.** Immunomarcatura con tecnica Western blot della tirosina idrossilasi (TH), della dopamina beta-idrossilasi (DBH), della somatostatina (SOM), del neuropeptide Y (NPY) e del trasportatore di vescicole di acetilcolina (VACHT) nei gangli spinali, in quelli del tronco simpatico e in quelli del midollo spinale di suino. Il numero alla sinistra di ogni colonna indica il peso molecolare. Le immagini sono state leggermente corrette in luminosità e contrasto per garantire un fondo uniforme.

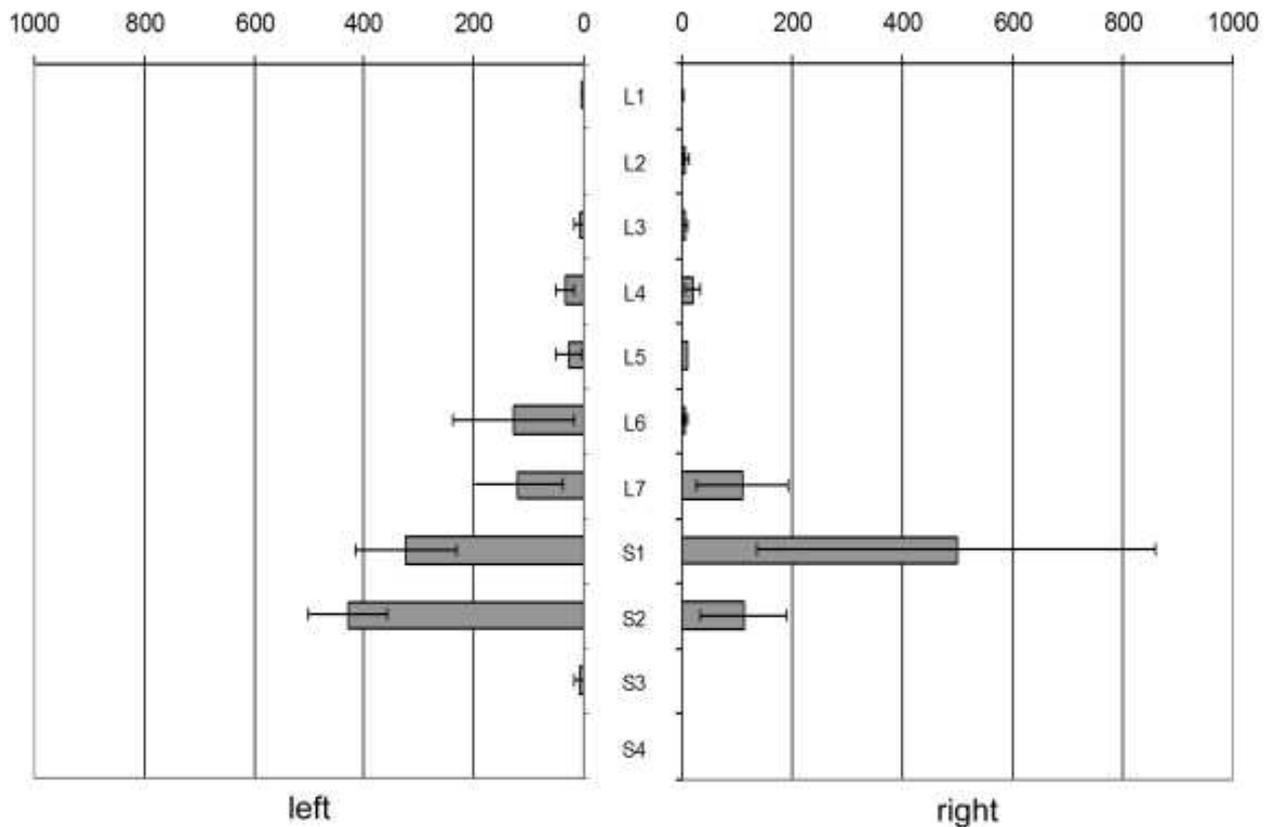
## Risultati

Utilizzando un tracciante fluorescente a trasporto retrogrado ha consentito di individuare e caratterizzare i neuroni destinati al trigono della vescica urinaria in tutti i campioni raccolti.

### Gangli del tronco simpatico

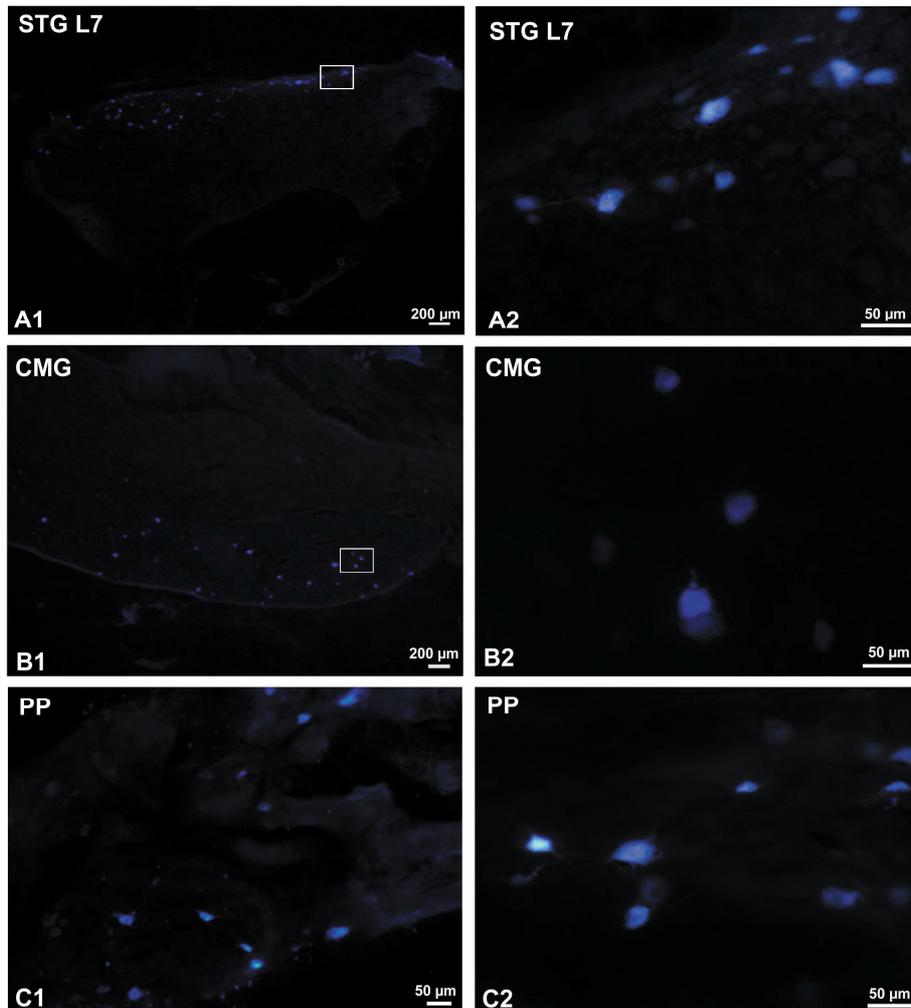
I neuroni FB+ nei gangli della catena simpatica sono state osservate in entrambi i lati lungo il tratto.

Il numero medio di neuroni positivi al tracciante era di  $1845 \pm 59$  ed erano per la maggior parte ( $87 \pm 5\%$ ) localizzati al livello dei gangli L7-S2. La frequenza di distribuzione dei neuroni FB+ in ogni segmento della catena simpatica è mostrata nella Figura 2.



**Fig. 2.** Diagramma a barre che mostra la frequenza di distribuzione dei neuroni destinati al trigono della vescica urinaria (numero totale medio  $1845 \pm 259$   $n = 4$ ) in ogni livello segmentale dei gangli del tronco simpatico.

I neuroni FB+ nel tessuto osservato erano isolati o raggruppati in piccoli gruppi 2-3 neuroni, disseminati nel ganglio. Nei gangli che presentavano il maggior numero di marcate queste erano quasi esclusivamente localizzate lungo il margine del ganglio con una evidente organizzazione topografica (Figura 3, A1). Le cellule marcate erano tipici neuroni multipolari (Figura 3, A2), con forma ellittica, dove l'asse maggiore era generalmente orientato parallelamente all'asse longitudinale del ganglio. I neuroni FB+ mostravano il nucleo eccentrico. Dato che non si sono osservate differenze significative tra le dimensioni dei neuroni STG lombari e sacrali in ogni animale, o tra gli gruppi. Il valore medio delle aree dei pirenofori dei neuroni destinati al trigono nei neuroni della catena del simpatico era di  $466 \pm 83 \mu\text{m}^2$ . Per mezzo del test statistico one-way ANOVA ( $P < 0,001$ ) si sono comparati i valori medi delle dimensioni dei neuroni nei diversi campioni (STG, CMG e PP) e si sono osservate differenze significative riportate nella Figura 4.



**Fig. 3.** A) Immagine della sezione longitudinale del ganglio destro L7 del tronco simpatico (STG L7), uno dei gangli contenenti la più alta densità cellule Fast Blue positive (FB) destinate al trigono vescicale di maiale. A1) Distribuzione dei neuroni post-gangliari simpatici FB+ alla periferia del ganglio, per quanto visibile piccolo ingrandimento 1x; il rettangolo bianco indica l'area dalla quale è stata presa l'immagine mostrata in A2. A2) Morfologia dei neuroni post-gangliari simpatici marcati, ingrandimento 20x. B) Immagine della sezione longitudinale del ganglio mesenterico caudale destro (CMG). B1) Distribuzione dei neuroni post-gangliari simpatici FB+ alla periferia del ganglio, ingrandimento 1x; il rettangolo bianco indica l'area dalla quale è stata presa l'immagine mostrata in B2. B2) Morfologia degli stessi neuroni marcati, ingrandimento 20x. C) Immagine di una sezione di un micro-ganglio del plesso pelvico (PP) che mostra la distribuzione dei neuroni post-gangliari FB+ (C1). C2) Morfologia dei neuroni PP marcati, ingrandimento 20x.

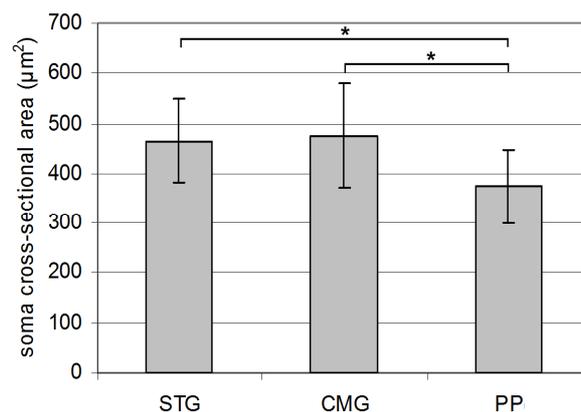
### Gangli mesenterici craniali

Di tutti i gangli mesenterici craniali prelevati dai diversi animali utilizzati nel presente studio solo uno di questi ha mostrate cellule marcate con il FB, solo 8 neuroni FB+ in un CrMG di sinistra. L'esiguo numero di cellule osservate non consentite di fare valutazioni statistiche o descrizioni morfologiche.

### Gangli mesenterici caudali

Il numero medio di neuroni FB+ trovato nei CMG bilaterali è stato di  $4288 \pm 1451$ , con la maggioranza di queste cellule ( $66 \pm 14\%$ ) localizzate nel ganglio sinistro.

Le cellule marcate sono state trovate quasi esclusivamente lungo un margine dei CMG con una evidente organizzazione topografica (Figure 3, B1). Queste cellule erano tipici neuroni multipolari (Figura 3, B2), con il loro asse maggiore generalmente orientato parallelamente all'asse longitudinale del ganglio. I neuroni erano generalmente ovali e rapidamente identificabili per il loro grande nucleo rotondo. Poiché il valore medio delle loro aree non mostrava differenze significative tra i 4 soggetti, abbiamo raggruppato insieme tutte le misure dei neuroni CMG destinati nell'UBT proveniente da tutti gli animali per un totale di  $476 \pm 104 \mu\text{m}^2$  (Figura 4). Il valore medio risultante non era significativamente diverso da quello dei neuroni STG destinati all'UBT (test post-hoc di Tukey,  $P > 0,05$ ).



**Fig. 4.** Istogramma delle dimensioni medie ( $\pm$  SEM, n = 4 maiali) dei neuroni post-gangliari destinati al trigono della vescica urinaria nei gangli del tronco simpatico (STG), nei gangli mesenterici caudali (CMG) e nei gangli pelvici (PP).

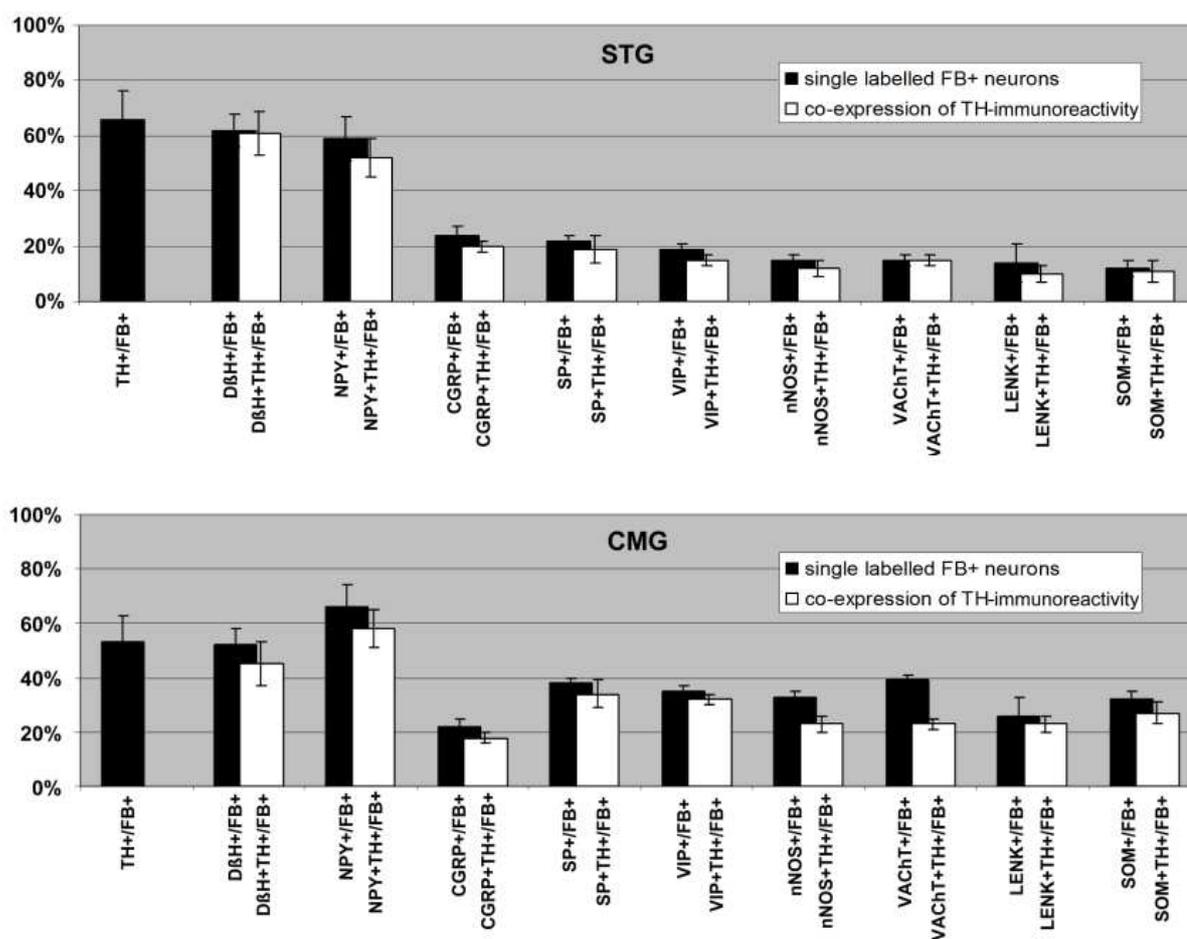
Per determinare l'area del pirenoforo dei neuroni FB+ sono state misurate almeno duecento cellule marcate di ogni classe neuronale, in ogni animale. L'analisi statistica one-way ANOVA ha rivelato delle differenze significative ( $P < 0,001$ ) tra le dimensioni medie dei neuroni nei tre tipi di gangli. Gli asterischi in figura indicano una differenza significativa ( $*P < 0,05$ ) ottenuta comparando i neuroni PP *vs* CMG e STG attraverso il test *post-hoc* di Tukey.

### **Plesso pelvico**

Neuroni fast blue positivi sono stati costantemente trovati nel PP; infatti, un numero medio di  $4793 \pm 1991$  neuroni FB+ è stato trovato bilateralmente nel plesso pelvico, localizzati nell'angolo tra la terminazione dei dotti deferenti dell'uretra e la parte craniale della ghiandola vescicolare. La maggior parte ( $61 \pm 13\%$ ) di questi neuroni FB+ si presentava isolata o raggruppata all'interno dei micro-gangli di destra. I neuroni FB+ del plesso pelvico mostravano la tipica morfologia dei neuroni multipolari (Figura 3, C1-C2) e il valore medio delle aree del loro pirenoforo erano simili nei 4 soggetti, così si è potuto raggruppare tutte le misurazioni morfometriche dei neuroni FB+ del PP destinati al trigono vescicale, in un unico gruppo ottenendo un valore pari a  $375 \pm 86 \mu\text{m}^2$  (Figura 4). Questo valore era significativamente più piccolo di quello riscontrato nei i CMG e STG (test *post-hoc* di Tukey,  $P < 0,05$ ).

### **L'immunoistochimica dei gangli simpatici**

Abbiamo eseguito la tecnica immunoistochimica sui gangli del troco simpatico (STG) e sui gangli mesenterici (CMG).



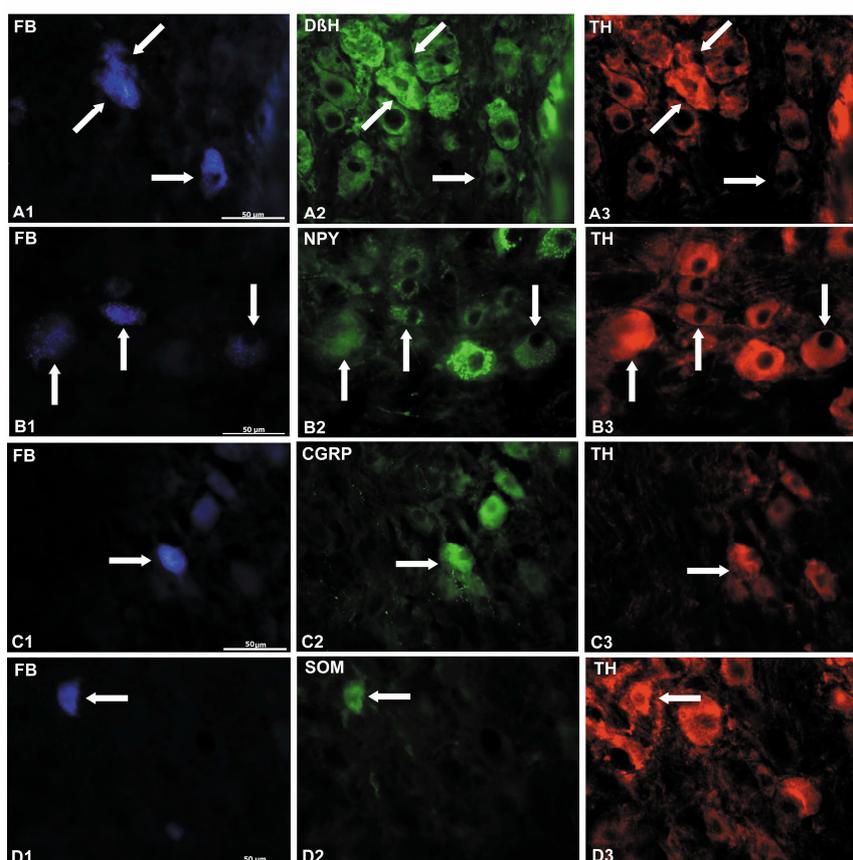
**Fig. 5.** Gli istogrammi mostrano le percentuali medie  $\pm$  SEM ( $n = 4$  maiali) dei neuroni FB+ dei gangli del tronco simpatico (STG) e dei gangli mesenterici caudali (CGM) destinati al trigono vescicale di maiale; sono rappresentati i neuroni FB+ immunoreattivi (+) ad ogni anticorpo e la percentuale di questi neuroni FB+ che ha anche co-espresso immunoreattività al TH (TH+).

### Gangli del tronco simpatico

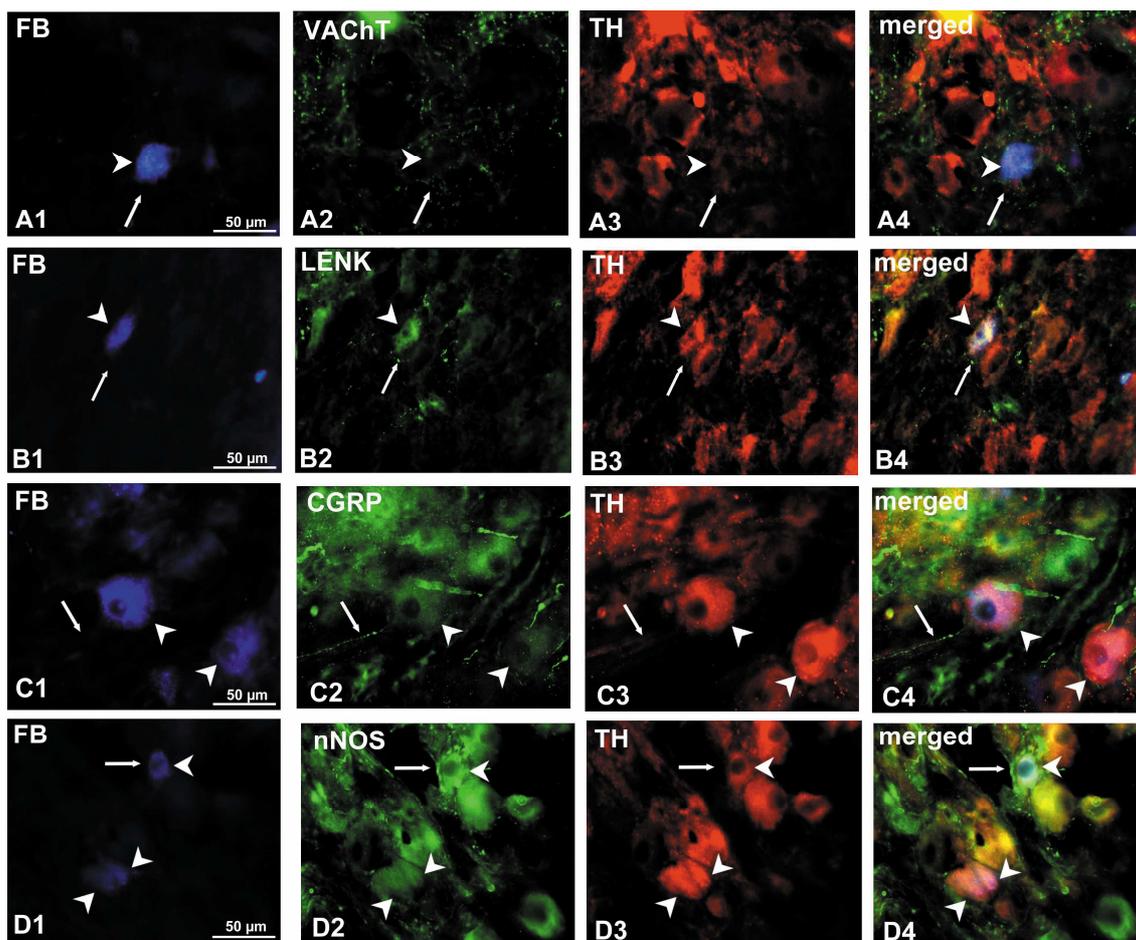
Ogni combinazione di anticorpi primari è stata testata, in ciascun animale, su un numero medio di neuroni FB+ pari a  $236 \pm 22$ . La percentuale di neuroni FB+ e immunoreattivi ad uno dei *markers* utilizzati in questa ricerca, o co-esprimenti anche TH-IR, era pari al  $66 \pm 10\%$ ; la quasi totalità, il  $92 \pm 7\%$ , di questi neuroni ha co-espresso DβH-IR, evidenziando una natura catecolaminergica (Figura 6, A1-A3). Il  $59 \pm 8\%$  di neuroni FB+ erano anche NPY-IR, mentre il  $52 \pm 7\%$  di essi co-esprimeva TH- e NPY-IR (Figura 6, B1-B3). I neuroni destinati all'UBT hanno mostrato anche positività per tutti gli altri marcatori usati nelle seguenti percentuali: per il CGRP il  $24 \pm 3\%$ , per la SP il  $22 \pm 2\%$ , per il VIP il  $19 \pm 2\%$ , per l'nNOS il  $15 \pm 2\%$ , per il VACht il  $15 \pm 2\%$ , per il LENK il  $14 \pm 7\%$  e

per la SOM il  $12\pm 3\%$ . Inoltre i neuroni FB+/TH-IR co-esprimevano nelle seguenti percentuali anche il CGRP per il  $20\pm 2\%$  (Figura 6, C1-C3), la SP per il  $19\pm 5\%$ , il VIP per il  $15\pm 2\%$ , il VAcHT per il  $15\pm 2\%$ , l'nNOS per il  $12\pm 3\%$ , la SOM per il  $12\pm 4\%$ ) (Figura 6, D1-D3) e la LENK per l' $11\pm 3\%$ .

Le fibre VAcHT- (Figura 7A), CGRP-, LENK-IR (Figura 7B) e, in misura minore, le nNOS-IR formavano delle varicosità intorno ai neuroni FB+.



**Fig. 6.** Immagini a fluorescenza di sezioni longitudinali del ganglio sacrale (S1) del tronco simpatico di maiale contenente i pironofori positivi al FB, co-esprimenti TH, e uno dei differenti marcatori impiegati in questo studio. Nel gruppo di figure contrassegnate dalla lettera A, le frecce indicano tre pironofori positivi al FB (A1) co-esprimenti D $\beta$ H (A2) e TH (A3). Nel gruppo di figure contrassegnate dalla lettera B, le frecce indicano pironofori positivi al FB (B1) co-esprimenti NPY (B2) e TH (B3). Nel gruppo di figure contrassegnate dalla lettera C, le frecce puntano verso un neurone positivo al FB (C1) co-esprime anche CGRP (C2) e TH (C3). In C2 sono inoltre visibili delle fibre nervose varicose CGRP-IR. Infine, nel gruppo di figure contrassegnate dalla lettera D, la freccia punta verso un neurone positivo al FB (D1) co-esprimente SOM (D2) e TH (D3).



**Fig. 7.** Immagini di sezioni ottenute dal ganglio S1 della catena simpatica (A1-B4) e dal ganglio mesenterico caudale (C1-D4) del maiale. A) la punta della freccia mostra un neurone destinato al trigono (pirenoforo positivo al FB) (A1), positivo anche al TH (A3, con *Texas Red*) e al VChT (A2, con FITC), ma circondato da una trama di terminazioni nervose (indicate dalle frecce) VChT-IR (A2, con FITC); immagini del *merge* in A4. B) la punta della freccia mostra un neurone positivo al FB (B1) immunoreattivo sia al LENK (B2, con FITC) che al TH (B3, con *Texas Red*); delle fibre nervose singole immunoreattive al LENK (con FITC) sono interposte ai neuroni del ganglio, indicate dalla freccia. Una immagini del *merge* è visibile in B4. C) le punte di freccia indicano due neuroni positivi al FB (C1) che co-esprimono il CGRP (C2, con FITC) e il TH (C3, con *Texas Red*); Alcune fibre nervose CGRP-IR (con FITC) indicate dalla freccia sono osservabili tre e sopra i neuroni gangliari; Una immagine del *merge* è visibile C4. D) le punte della freccia evidenziano i neuroni FB+ co-esprimenti nNOS (D2, con FITC) e TH (D3, con *Texas Red*); le frecce indicano delle fibre nNOS-IR (con FITC) che circondano i neuroni del ganglio; Una immagine del *merge* è visibile in D4.

### Gangli mesenterici caudali

E' stato utilizzato un numero medio di  $487 \pm 48$  neuroni FB+ dei gangli mesenterici caudali osservati in ciascun osservati animale per testare le combinazioni di anticorpi

primari. Le percentuali di neuroni FB+ che hanno espresso positività per un *marker* e i neuroni FB+/TH-IR che co-esprimevano anche uno degli altri marcatori utilizzati in questo studio sono riportate in Figura 5.

In media, circa metà dei neuroni FB+ ( $53\pm 8\%$ ) co-esprimeva il TH e la maggior parte ( $87\pm 6\%$ ), di questi neuroni ha co-espresso D $\beta$ H-IR, evidenziando una natura catecolaminergica. Una discreta quantità ( $66 \pm 7\%$ ) dei neuroni FB+ co-esprimeva NPY-IR, mentre il  $58\pm 6\%$  co-esprimeva TH- e NPY-IR. I neuroni destinati al trigono vescicale mostravano, inoltre, positività a tutti gli altri marcatori usati nelle seguenti percentuali: al CGRP per il  $22\pm 3\%$ , alla SP per il  $38\pm 8\%$ , al VIP per il  $35\pm 4\%$ , all'nNOS per il  $33\pm 8\%$ , al VAcHt per il  $35\pm 5\%$ , al LENK per il  $26\pm 9\%$  e alla SOM per il  $32\pm 7\%$ . Inoltre, neuroni FB+/TH-IR co-esprimevano CGRP- nel  $18\pm 5\%$ , SP- nel  $34\pm 7\%$  (Figura 8, A1-A3), VIP- nel  $32\pm 2\%$  (Figura 8, B1-B3), VAcHt- nel  $23\pm 3\%$  (Figura 8, C1-C3), nNOS- nel  $23\pm 6\%$  (Figura 8, D1-D3), SOM- nel  $27\pm 4\%$  e LENK-IR nel  $23\pm 3\%$  (Figura 8, E1-E3). Le fibre LENK-IR e nNOS-IR (Figura 7D) formavano varicosità intorno ai neuroni FB+.

**Fig. 8.** Immagini di sezioni del CMG di maiale dove sono osservabili dei pirenofori positivi al FB co-esprimenti TH e uno degli altri *markers* utilizzati in questo studio. A) le frecce indicano due pirenofori FB+ (A1) co-esprimenti la SP (A2) e il TH (A3). B) le frecce indicano due corpi neuronali FB+ (B1) co-esprimenti sia il VIP (B2) e che il TH (B3). C) la freccia indica un neurone (C1) marcato anche con il VAcHT (C2) e il TH (C3). D) le frecce indicano neuroni al FB+ (D1) che co-esprimevano l'nNOS (D2) e il TH (D3). E) le frecce indicano due neuroni FB+ (E1) marcati anche con il LENK (E2) e il TH.

## **Discussione**

### ***Localizzazione dei neuroni FB+***

I neuroni post-gangliari destinati al trigono vescicale sono stati osservati nei tratti L1-S3 della catena simpatica, nei CMG e nel PP, mentre pochissime cellule FB+ sono state osservate nel CrMG. Di rilievo l'osservazione che l'87±5% del totale dei neuroni FB+ contati erano concentrati nei gangli L7-S2. I risultati di questa ricerca sono in accordo con quanto già pubblicato sull'innervazione della vescica. E' noto che la vescica viene innervata da tre coppie di nervi: 1. I nervi ipogastrici - contenenti principalmente fibre simpatiche post-gangliari e poche fibre pre-gangliari destinate ai così detti neuroni adrenergici brevi (short adrenergic neurons) localizzati in gangli contigui alla vescica e ad altri organi pelvici (Feher e Vajda, 1981; Downie et al. 1984; Pidsudko, 2004); il nervo ipogastrico contiene anche fibre sensitive prevalentemente nocicettive (Bossowska et al. 2009; Russo et al. 2013); 2. I nervi pelvici - contenenti principalmente fibre pre-gangliari parasimpatiche, che raggiungono i neuroni (parasimpatici) del plesso pelvico e dei gangli intramurali; sono in essi presenti anche fibre post-gangliari (Crowe et al. 1986; Crowe e Burnstock, 1989; Gabella, 1990; Lasanen et al. 1992; Uvelius e Gabella, 1998) e fibre sensitive soprattutto meccanocettive (Russo et al. 2013); 3. I nervi pudendi, destinati all'innervazione motoria del muscolo uretrale contiene anche fibre sensitive vescicali (de Groat e Booth, 1993; de Groat et al. 1993).

Possiamo ipotizzare che tutte le fibre del SNA destinate al trigono vescicale attraversano il PP. Le fibre che originano dai gangli della catena simpatica lombare (L1-L6) raggiungono il PP insieme ai nervi ipogastrici; la maggior parte delle fibre che originano dai tratti più caudali (L7-S2) seguono i nervi pelvici.

Un'altra osservazione interessante è la rilevazione di una distribuzione viscerotopica dei neuroni FB+ coinvolti nella innervazione dell'UBT nei gangli del tronco simpatico (L7-S2) e nel CMG, mentre nella restante parte dei gangli della catena simpatica si sono potute osservare pochissime cellule FB+ senza una particolare organizzazione topografica.

Nel maiale, come in altre specie, è già stata dimostrata una organizzazione viscerotopica dei neuroni dei gangli prevertebrali destinati a diversi organi (Kaleczyc et al. 1995; Kaleczyc, 1998; Majewski, 1999; Pidsudko et al. 2001). Per quanto riguarda la STG, la letteratura riporta un'organizzazione viscerotopica solo per i neuroni destinati al

colon (Skobowiat et al 2010). In questa ricerca sono state descritte le caratteristiche morfometriche dei neuroni FB+. I neuroni erano generalmente piccoli (area di  $1000\mu\text{m}^2$ ; diametro di  $40\mu\text{m}$ ); in particolare, nel PP, i neuroni FB+ erano più piccoli di quelli della catena simpatica e del CMG. Questo può essere dovuto al fatto che essi sono localizzati più vicini all'UBT, o al basso livello di androgeni presenti nei suinetti di 3 mesi di età (Colenbrander et al.1978). Gli effetti degli androgeni si fanno risentire infatti non solo sulla dimensione dei neuroni coinvolti nella riproduzione ma anche su quella dei neuroni di vescica e intestino (Keast e Saunders, 1998).

## **Immunoistochimica**

### ***Immunoreattività alla tiroxina idrossilasi e/o dopamina beta-idrossilasi***

Nei gangli della catena simpatica le reazioni di immunoistochimica hanno evidenziato che solo il 60% dei neuroni destinati all'UBT esprimevano fenotipo adrenergico (TH/D $\beta$ H-IR) e preferenzialmente esprimevano NPY. Nel CMG, la percentuale di neuroni adrenergici era ancor più bassa (circa il 45%). Inoltre, le cellule TH/NPY-IR rappresentavano circa il 60% dei neuroni destinati all'UBT.

Sebbene nella catena simpatica fossero presenti grandi neuroni FB+ (con diametro compreso tra  $40$  e  $65\mu\text{m}$ ), i neuroni adrenergici e NPY-IR erano più piccoli (area  $< 1000\mu\text{m}^2$  e diametro di  $40\mu\text{m}$ ) e preferibilmente localizzati alla periferia del ganglio.

L'evidenza di una così bassa percentuale di neuroni del sistema nervoso simpatico esprimenti fenotipo non-adrenergico (TH e D $\beta$ H negativi) è sicuramente uno dei dati più interessanti della ricerca.

Studi precedenti eseguiti nel maiale e in altri Mammiferi avevano infatti rilevato che, la grande maggioranza dei neuroni della catena simpatica (Hill e Elde, 1989) e del CMG (Kaleczyc et al. 2003; Majewski e Heym, 1992) sono noradrenergici. Le differenze osservate nei nostri risultati possano essere correlate all'età degli animali usati nella nostra ricerca. Infatti, è noto che le proprietà immunoistochimiche dei neuroni simpatici possono cambiare con l'età (Maslyukov et al. 2007) e che i neuroni autonomi che innervano gli organi genitali (Sienkiewicz, 2010; Keast, 1999), la vescica e l'intestino sono influenzati dagli ormoni steroidei (Keast, 1999; Keast, 2000). Il basso livello di testosterone sierico, documentato da Colenbrander et al. (1978) in suinetti di 3 mesi potrebbe spiegare le basse percentuali di neuroni fenotipicamente adrenergici trovati nel nostro studio, soprattutto

se comparate con quelle ottenute su soggetti adulti e sessualmente maturi (di più di 100 KG e 8 mesi di età) di sesso femminile (Koszykowska et al. 2010) o maschile (Sienkiewicz, 2010). Si dovrebbe inoltre considerare il tipo di target raggiunto dai neuroni; infatti, le percentuali di neuroni adrenergici osservate nella presente ricerca sono simili a quelle riportate da Pidsudko (Pidsudko, 2004) in una ricerca sui neuroni intramurali localizzati nel trigono vescicale di scrofette di 10 Kg. Quindi, i neuroni con corredo adrenergico destinati all'UBT di maiale potrebbero non essere molto numerosi negli STG e nei CMG perché un'altra sottopopolazione di neuroni adrenergici è presente nei gangli intramurali dell'UBT. Il corredo neurochimico, la particolare distribuzione e la ridotta dimensione dei neuroni FB+ fanno ipotizzare una loro funzione vasocostrittrice, in accordo con la più recente ricerca condotta su altre specie (Majewski, 1999; Heym et al. 1990; Trudrung et al. 1994; McLachlan, 1995; Gibbins, 2000). La vasocostrizione potrebbe non essere la sola possibile funzione; infatti, Larsen et al. (Larsen et al. 1978) e Lakomy et al. (Lakomy, 1989), hanno trovato nell'UBT di suino numerose fibre nervose adrenergiche apparentemente correlate con la tonaca muscolare della vescica e con la parete muscolare dei vasi sanguigni. Quindi, i neuroni adrenergici destinati all'UBT dovrebbero aver anche una funzione visceromotrice. Il ruolo dei neuroni adrenergici visceromotori sul muscolo liscio dell'UBT appare complesso. Secondo Yamanishi et al. (Yamanishi et al. 2003) il ruolo funzionale della base della vescica, incluso il trigono vescicale, è aprire e chiudere il collo della vescica durante il riempimento e svuotamento, rispettivamente. La muscolatura a livello di trigono è sensibile alla noradrenalina (presenza di recettori  $\alpha$ ) (Yamanishi et al. 2003, Caine et al. 1975; Khanna et al. 1981). Durante il riempimento della vescica la stimolazione adrenergica concorre alla contrazione della parte muscolare superficiale del collo della vescica (origine mesodermica). La muscolatura più profonda, di origine endodermica, dotata, come tutta la muscolatura del detrusore di recettori adrenergici di tipo  $\beta$ , si rilassa. Ciò favorisce la dilatazione della vescica e il conseguente accumulo di urina (Yamanishi et al. 2003). Durante la minzione, il detrusore e la muscolatura trigonale reagiscono all'acetilcolina liberata dal nervo pelvico attraverso recettori muscarinici (Dass et al. 2001; Yamanishi et al. 2002).

### ***Immunoreattività al neuropeptide Y***

In generale, l'NPY potrebbe avere un ruolo nell'inibizione della neurotrasmissione non-adrenergica-non-colinergica (NANC), adrenergica e colinergica eccitatoria, come già ipotizzato da Persson et al. (Persson et al. 1995) i quali hanno osservato terminali NPY-IR correlati a fasci muscolari o a piccole arterie nella lamina propria del trigono di femmine adulte di suino.

### ***Immunoreattività al trasportatore vescicolare dell'acetilcolina***

La VAcHT-IR, da sola o associata con la TH-IR, indica che, oltre alla presenza di pirenofori colinergici nel ganglio pelvico (Kaleczyc et al. 2003) e nei gangli intramurali di natura parasimpatica (Lakomy et al. 1990; Pidsudko, 2004), anche i gangli para- e prevertebrali possono essere sede di neuroni con corredo colinergico destinati alla parete dell'UB (Lakomy et al. 1990; Persson et al. 1995). La co-localizzazione di marcatori colinergici e catecolaminergici è già stata osservata nella specie suina nei neuroni STG destinati al muscolo bulbo-spongioso (Gazza et al. 2003), al muscolo retrattore del pene (Botti et al. 2003) e al muscolo retrattore del clitoride (Ragionieri et al. 2008). Inoltre, ChAT e D $\beta$ H sono stati trovati co-localizzati nel ganglio cervicale craniale di feti di maiale (Wang et al. 1995). È noto che, durante lo sviluppo fetale, alcuni neuroni esprimono temporaneamente fenotipo nor-adrenergico, ma in seguito perdono le loro caratteristiche noradrenergiche assumendo fenotipo colinergico (Schafer et al. 1995; Keast et al. 1999; Masliukov e Timmermans, 2004). Nel trigono la funzione dell'innervazione colinergica potrebbe essere la modulazione pre-sinaptica della neurotrasmissione adrenergica eccitatoria (Sellers et al. 2012).

### ***Immunoreattività al peptide correlato al gene della calcitonina***

Il CGRP è comunemente considerato un marcatore delle vie afferenti (Majewski et al. 1995; Kaleczyc et al. 1997; Czaja et al. 2000); quindi la sua presenza nei neuroni FB+ della catena del simpatico può apparire inusuale e la sua co-localizzazione con il TH ancora di più. Comunque è riportato in bibliografia che si possono osservare neuroni FB+ che co-esprimono il CGRP ma sono negativi per il TH nei gangli della catena del simpatico di maiale (Gazza et al. 2003; Häppölä et al. 1993; Lakomy et al. 1994); anche

la co-localizzazione del CGRP con il TH è stata anche osservata, anche se in pochi neuroni, nei gangli della catena del simpatico destinati al muscolo bulbo-spongioso (Gazza et al. 2003) e al muscolo retrattore del clitoride (Ragionieri et al 2008). Persson et al (Lakomy et al. 1990) hanno osservato un piccolo numero di fibre con andamento varicoso CGRP-IR nello strato muscolare dell'UBT, di cui solo pochissime erano perivascolari. Inoltre, si sono osservate delle fibre CGRP-IR destinate ai neuroni dei gangli intramurali dell'UBT di maiale (Lindh et al. 1989), che in questa ricerca sono state interpretate come collaterali dei neuroni sensitivi nel tratto urinario, capaci di modulare l'attività del muscolo liscio per mezzo di una funzione efferente antidromica; In questo studio si è dimostrato il contributo peptidergico all'innervazione dell'UBT dei gangli autonomi. In accordo con Häppölä et al (Häppölä et al. 1993), si suppone che i neuroni a corredo peptidergico giochino un ruolo nella modulazione della neurotrasmissione in organi *target* dei gangli simpatici di suino.

### ***Immunoreattività alla sostanza P***

Molti studi svolti fino ad oggi considerano la SP assente nei neuroni della catena del simpatico (Skobowiat et al. 2010; Häppölä et al. 1993; Lakomy et al 1994) e nei gangli mesenterici caudali (Majewski e Heym, 1992) di maiale; in questa ricerca sono stati identificati alcuni neuroni SP-positivi nei neuroni dei gangli paravertebrali destinati al muscolo retrattore del pene (Botti et al. 2003), e alcuni neuroni, destinati al muscolo bulbo-spongioso, dei gangli della catena simpatica in cui la SP era co-localizzata con il TH (Gazza et al. 2003) e al muscolo retrattore del clitoride (Ragionieri et al 2008). La stessa co-localizzazione è già stata osservata in un numero moderato di neuroni dei gangli intramurali dell'UBT (Pidsudko). La presenza di neuroni SP-positivi e TH-negativi potrebbe essere spiegata prendendo in considerazione la efficace funzione vasodilatatoria di questa molecola, che potremmo ipotizzare essere presente nella funzione di modulazione del flusso sanguigno (Lindh et al. 1989). La presenza di neuroni co-esprimenti il TH e la SP potrebbe essere spiegata con ipotizzando un loro coinvolgimento in diversi riflessi viscerali e risposte neuroendocrine, come già ipotizzato per altre specie (Majewski et al. 1995; Traurig et al, 1991).

### ***Immunoreattività al polipeptide vasoattivo intestinale***

In alcuni neuroni dei gangli della catena del simpatico a livello cervicale (Häppölä et al. 1993), toraco-lombare (Hill e Elde; 1989; Lakomy et al 1994) e sacrale del maiale (Wang et al.1995) sono risultate VIP-IR, con delle differenze cranio-caudali. Delle discrepanze nei risultati quantitativi sulla positività a questo peptide nei neuroni destinati al trigono vescicale si sono riscontrate delle differenze intraspecifiche da diversi ricercatori. Infatti, Pidsudko (2004) non è riuscito a trovare nessuna cellula VIP-IR nelle fibre né nei neuroni intramurali dell'UBT di giovani femmine di maiale, mentre Crowe e Burnstock (Crowe et al. 1989) hanno descritto, in femmine adulte, la popolazione di neuroni VIP-IR come la seconda popolazione rappresentata nei gangli intramurali dell'UBT. Persson et al. (Persson et al. 1995) hanno anche descritto le terminazioni nervose VIP-IR, che accompagnano i fasci muscolari, come le più frequenti nello strato muscolare del trigono nella femmina adulta. Le differenze nei risultati riscontrate nei diversi studi viene attribuita all'uso di anticorpi differenti, di animali di età diversa o di diverse protocolli. Ne consegue che i nostri risultati potrebbero essere dovuti all'utilizzo di animali giovani. I neuroni VIP-ergici potrebbero giocare un ruolo nella regolazione del flusso sanguigno, perché, come l'NO, il VIP agisce come vasodilatatore sui vasi sanguigni degli organi genitali (Majewski et al. 1995; Polak et al. 1981; Morris et al, 1985;) e mostra un antagonismo fisiologico con l'NPY nel controllo del flusso sanguigno (Morris et al, 1985). In particolare, nel maiale il VIP riduce la tensione e l'ampiezza delle contrazioni spontanee della muscolatura del trigono (Klarskov et al. 1984) e contemporaneamente rilassa la muscolatura del collo della vescica (Yoshiyama et al. 2008). Anche la distribuzione delle fibre VIP-IR nel muscolo liscio, intorno ai vasi sanguigni e al di sotto dell'epitelio del tratto urinario di maiale (Crowe et al. 1989), suggerisce che questi neuroni VIP-ergici partecipino alla regolazione dell'attività del muscolo liscio, agendo come modulatori locali nella trasmissione neuromuscolare, nel controllo del flusso sanguigno e nell'attività epiteliale.

La co-localizzazione del TH con il VIP è già stata descritta nei neuroni STG sacrali destinati al muscolo bulbo-spongioso (Gazza et al. 2003) e al muscolo retrattore del clitoride (Ragionieri et al 2008). Alcuni neuroni VIP-/D $\beta$ H-IR con funzione vasodilatatoria, sono stati osservati nei gangli della catena toracica simpatica di suino (Majewski, 1999; Hill e Elde, 1989). Comunque, la co-espressione del TH con il VIP è

inusuale, visto che il VIP è considerato come un un marcatore dei circuiti colinergici o delle vie inibitorie non-adrenergica-non-colinergica (NANC) del sistema nervoso autonomo (Yoshiyama et al. 2008; Itoh et al. 1995). Inoltre, secondo Hill e Elde (Hill e Elde, 1989) questi neuroni TH/VIP-IR potrebbero avere anche una azione vasodilatatoria.

### ***Immunoreattività all'ossido nitrico sintasi neuronale***

Si è recentemente dimostrato che l'innervazione nNOS-IR dell'UBT di maiale può originare anche da neuroni DRG (Russo et al. 2013), e questo studio si evidenzia il contributo dei gangli della catena del simpatico, anche se di modeste dimensioni. Vi è una cospicua innervazione nNOS-IR nell'UBT di maiale, anche nello strato muscolare liscio (Persson et al. 1995), dove si osserva insieme alle fibre e ai fasci muscolari che circondano le arterie di piccole dimensioni, formanti dei plessi intorno ai fasci muscolari che circondano i neuroni gangliari (Pidsudko, 2004) intramurali dell'UBT. Questi dati sono in linea con gli studi funzionali che dimostrano che l'NO può avere un ruolo inibitorio nella neurotrasmissione al trigono di maiale ed essere coinvolto nel rilassamento mediato dall'acetilcolina epitelio-dipendente delle arterie vescicali del maiale (Persson e Andersson, 1992; Persson et al. 1993). Si possono fare solo speculazioni sul ruolo fisiologico della vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico nella vescica. La parete della vescica subisce costantemente dei cambiamenti di tensione murale durante il riempimento, che possono avere degli effetti sul flusso sanguigno. Se il flusso sanguigno diminuisce durante il riempimento della vescica (Dunn, 1975, 94), si ha una attivazione dei meccanismi vasodilatatori per fornire ossigeno al muscolo detrusore. La co-localizzazione del nNOS con il TH è stata osservata fin da subito in alcuni neuroni dei gangli paravertebrali destinati al muscolo bulbo-spongioso del maschio (Gazza et al. 2003) e al muscolo retrattore del clitoride (Ragionieri et al 2008). L'espressione dell'ossido nitrico nei neuroni TH-IR potrebbe essere dovuta al ruolo di modulatore sull'attività dei neuroni TH-IR; Infatti l'NO può indurre un aumento dell'attività dei neuroni post-gangliari TH-IR, per mezzo di meccanismi sia GMPc (guanosina monofosfato ciclico) dipendenti che GMPc indipendenti (Klimaschewski et al. 1996).

### ***Immunoreattività alla leu-encefalina***

I neuroni LENK-IR e LENK/TH-IR osservati nel presente studio potrebbero essere l'origine del piccolo numero di fibre varicose LENK-IR trovate nello strato muscolare del trigono vescicale (Persson et al. 1995). La co-esistenza della LENK, o di altre encefaline, con il TH nei neuroni para-vertebrali di maiale è stata osservata solo in alcuni neuroni destinati al muscolo bulbo-spongioso del maiale (Gazza et al. 2003) e al muscolo retrattore del clitoride (Ragionieri et al 2008).

Nel maiale, la presenza di peptidi oppioidi è stata osservata nei neuroni dei gangli della catena del simpatico a livello cervicale (Häppölä et al. 1993), toraco-lombare (Lakomy et al 1994) e sacrale (Gazza et al. 2003; Botti et al. 2003), indipendentemente dalla presenza di TH. Inoltre, LENK-IR e, in generale, una presenza di peptidi oppioidi è stata osservata in alcune fibre destinate gli organi genitali della scrofa (Czaja et al. 1996; Gazza et al. 2009). In accordo con Crowe e Bunstock (1989), i neuroni LENK-IR potrebbero avere una azione inibitoria su molti neuroni intramurali della vescica, o, più in generale, un ruolo di regolazione nella neurotrasmissione nel trigono vescicale e nei vasi. Infatti, la co-espressione di encefaline con la nor-adrenalina nei gangli simpatici (Konishi et al. 1981) e nelle fibre destinate gli organi genitali (De Potter et al. 1987), suggerisce che questi peptidi possano modulare (inibire) pre-sinapticamente gli *input* simpatici alla giunzione neuro-effettrice (Czaja et al. 1996, Klarskov, 1987). La stessa co-esistenza della LENK e delle catecolamine osservata in diverse fibre nervose perivascolari nor-adrenergiche (Owman et al. 1988) suggerisce che le encefaline possano anche avere un effetto vasodilatatore dovuto alla loro azione inibitrice sulla neurotrasmissione autonoma (Kaleczyc, 1998; Kaleczyc et al. 1997; Konishi et al. 1981).

### ***L'immunoreattività alla somatostatina***

I neuroni SOM-IR e SOM/TH-IR osservati nel presente studio potrebbero rappresentare l'origine delle fibre varicose SOM-IR trovate nello strato muscolare del trigono di maiale (Persson et al. 1995) o che quelle che innervano i gangli intramurali dell'UBT di suino (Pidsudko, 2004). I neuroni SOM-IR sono già stati osservati nei gangli della catena del simpatico in altri studi (Haberberger et al. 2000; Lacroix et al. 1992), mentre neuroni sia SOM/TH-IR che SOM-IR/TH-negativi sono stati descritti nei CMG di maiale (Majewski e Heym,1992;). Secondo Lacroix et al (Lacroix et al. 1992),

Majewski e Heym (Majewski e Heym,1992;) e Majewski (1999) è possibile ipotizzare un ruolo vasocostrittore per questi neuroni.

Significato funzionale delle fibre nervose in rapporto con i neuroni FB+ nei gangli simpatici.

In questo studio sono stati osservati neuroni FB+ circondati da fibre VAcHT-, CGRP-, LENK-, e nNOS-IR sia nei gangli della catena simpatica che nei gangli mesenterici caudali. Il numero e la distribuzione di queste fibre sono simili a quelli già descritti da Skobowiat et al. (Skobowiat et al. 2010) per le fibre che circondano i neuroni destinati al colon provenienti dai gangli della catena del simpatico di maiale, mentre la presenza di fibre VAcHT-, CGRP- e LENK-IR che noi abbiamo osservato nei CMG è in accordo con quanto già descritto da Kaleczyc et al. (Kaleczyc et al. 2003;) nei CMG di maiali maschi. Le numerose fibre nervose VAcHT-IR che circondano i pirenofori FB+ nei gangli della catena simpatica e nei CMG, potrebbero originare dai neuroni colinergici pre-gangliari localizzati nel nucleo intermedio laterale del midollo spinale (Kaleczyc et al. 2003; Gibbinse Morris, 2000). Inoltre parte delle fibre LENK-IR che circondano o che si avvicinano ai neuroni FB+ probabilmente originano dai neuroni della catena simpatica o costituiscono proiezioni viscerofugali dalla parete dell'intestino. I neuroni intestino-fugali sono considerati come elementi sensitivi localizzati nel plesso mioenterico (ma anche sottomucoso) dell'intestino. Sono gli unici neuroni che inviano il loro neurite all'esterno dell'intestino, verso i gangli pre-vertebrali. Nel sistema nervo enterico i neuroni LENK-IR sono presenti più che nei gangli spinali di suino (Kaleczyc et al. 2002), mentre sono assenti nei nuclei pre-gangliari (Kaleczyc et al. 2003; Merighi et al. 1990; Brown et al. 2004; Brown et al. 2004; Grundy e Schemann, 2005). Le fibre nervose CGRP-IR osservate originano dai neuroni afferenti dei gangli spinali (14, Kaleczyc et al. 2003; Majewski e Heym,1992; Brown et al. 2004, Traub et al. 1999). Infine, le fibre nNOS-IR possono originare dai neuroni pre-gangliari localizzati nel nucleo intermedio-laterale del midollo spinale lombare o dai neuroni dei gangli spinali (Russo et al. 2013). L'ossido nitrico è presente in più di una sottopopolazione funzionale di neuroni pre-gangliari simpatici e può avere un ruolo sia come trasmettitore, che agisce direttamente, sia come un modulatore dell'informazione efferente, oltre ad essere coinvolto nella neurotrasmissione afferente (Anderson et al. 1993; Anderson et al. 1995; Anderson et al.

1995). Di conseguenza, anche le fibre nNOS-IR che noi abbiamo osservato intorno ai neuroni destinati all'UBT potrebbero rappresentare tanto proiezioni centripetali dai nuclei dei neuroni del sistema nervoso autonomo nel midollo spinale, quanto collaterali dei neuroni sensitivi con funzioni integrative.

## **Conclusioni**

Il presente studio dimostra il coinvolgimento di differenti categorie di gangli del SNA sull'innervazione dell'UBT di maiale. In particolare, abbiamo dimostrato, per la prima volta, che oltre al ben noto contributo del PP e del CMG al controllo nervoso dell'UBT, c'è anche una cospicua partecipazione dei gangli del tronco simpatico, con una larga estensione cranio-caudale, come già mostrato per il gatto (Kuo et al. 1984). Abbiamo inoltre documentato che il corredo neurochimico dei neuroni simpatici destinati all'UBT è quantitativamente diversificato, ma qualitativamente simile, nei gangli del tronco simpatico e nei gangli mesenterici caudali, dove i neuroni sono non solo adrenergici, ma contengono anche acetilcolina e altri peptidi regolatori. In particolare, le sostanze con una azione regolatrice/modulatrice appaiono essere più importanti dei classici neurotrasmettitori, *i.e.* l'adrenalina o l'acetilcolina.

La conoscenza dei diversi neurotrasmettitori e peptidi regolatori presenti nei neuroni simpatici che innervano il trigono della vescica urinaria può essere utile per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento delle patologie neurogene della vescica.

# Fase 4

## Innervazione sensitiva del muscolo uretrale di maiale

**Gazza F, Ragionieri L, Botti M, Chiocchetti R, Giancola F, Sorteni C, Panu R.**

**Sensory innervation of the porcine urethral muscle.**

**LXII Congresso Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (S.I.S.Vet), 17-19 settembre 2013, Brescia, Italia.**

Il muscolo uretrale (MU) è un muscolo pelvico, striato, coinvolto nel controllo volontario della minzione, che necessita di complesse interazioni tra il sistema nervoso autonomo e le vie afferenti, da un lato, e quelle efferenti dall'altro. Le fibre afferenti, che affiancano i nervi pudendi, sono mieliniche e amieliniche modulano l'attività della vescica in virtù della loro sensibilità al flusso di urina, alla contrazione detrusore e agli stimoli nocicettivi (de Groat et al., 2001; Yoshimura et al., 2003). Per approfondire la conoscenza delle vie viscerali nocicettive e dei meccanismi escretori abbiamo studiato la distribuzione, la morfologia e le caratteristiche neurochimiche dei neuroni sensitivi che innervano il muscolo uretrale del maiale, ritenuto un valido modello animale per gli studi biomedici.

In seguito ad iniezione di 50 µl di Fast Blu (FB) nella parte ventrale del MU di tre soggetti di sesso maschile (interi) del peso di 40 Kg, ed in seguito ad un opportuno periodo di sopravvivenza, necessario alla migrazione a ritroso del tracciante, sono stati prelevati il midollo spinale e i relativi gangli spinali nel tratto compreso tra Th14 e Ca1. Le criosezioni ottenute al criostato sono state sottoposte a tecniche di immunofluorescenza indiretta al fine di valutare la co-espressione, da parte dei neuroni FB+, del recettore TRPV1 (o VR1, vanilloid receptor 1; vedi fase 1-2) con altri *markers* neuronali quali la sostanza P (SP) e l'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS).

La ricerca, che è ancora “in progress”, ha permesso di individuare circa un migliaio di neuroni FB+ distribuiti bilateralmente nei gangli spinali nel tratto S2-S4. La loro area presentava valori compresi tra 300µm<sup>2</sup> e 2000µm<sup>2</sup>. Gran parte (~69%) dei

neuroni FB+ era immunoreattiva al VR1 (VR1-IR). Il 16% dei neuroni sensitivi nocicettivi destinati al muscolo uretrale (FB+ e TRPV1-IR) esprimeva nNOS-IR mentre solo il 6% esprimeva SP-IR. Gli esperimenti di co-localizzazione hanno dimostrato che solo il 12% circa di questi neuroni FB+ co-esprimeva anche nNOS-IR, mentre solo il 4% circa presentava SP-IR.

La presenza di neuroni FB+ quasi esclusivamente in S2-S4 suggerisce che le fibre afferenti dal muscolo uretrale del maiale seguano la via dei nervi pudendi.

I neuroni VR1-IR di piccola/media dimensione dovrebbero fornire fibre nocicettive amieliniche in grado di rispondere agli stimoli chimici e meccanici, come già dimostrato (de Groat e Yoshimura, 2009). L'attivazione di queste vie afferenti è in grado di innescare sensazioni dolorifiche e conseguenti meccanismi di difesa, come infiammazione e iperattività vescicale, che hanno lo scopo di eliminare dal tratto urinifer gli agenti infettivi o irritanti potenzialmente dannosi.

I neuroni nNOS sono stati osservati in un modesto numero di neuroni FB+, ma è noto che il loro numero aumenta in seguito a lesioni. Questi neuroni sintetizzano l'NO, un neurotrasmettitore gassoso che dovrebbe agire in maniera retrograda sia negli gangli spinali che nel midollo spinale modulando l'azione dei circuiti locali multi-sinaptici adibiti alla nocicezione (de Groat e Yoshimura, 2009).

Pochi erano i neuroni SP-IR destinati al MU; comunque una gran parte di questi co-esprimeva TRPV1-IR; questi neuroni potrebbero innescare riflessi autonomi in grado di modulare l'attività della muscolatura vescicale.

In conclusione, i nostri risultati indicano un importante ruolo della nocicezione tra le informazioni afferenti dall'UM che possono facilitare il riflesso della minzione e promuovere il completo svuotamento della vescica.

# Conclusioni

Questo lavoro ha analizzato le vie nervose sensitive ed efferenti coinvolte nel riflesso della minzione e nell'accumulo dell'urina nella specie suina. La conoscenza delle caratteristiche anatomiche, neurochimiche, e funzionali delle vie nervose deputate alla percezione della sensibilità vescicale e uretrale così come di quelle coinvolte nel controllo muscolare della vescica e del muscolo uretrale è di fondamentale importanza per la chirurgia urologica terapeutica e sperimentale. Queste conoscenze sono inoltre di particolare importanza per la comprensione dei sintomi post-traumatici in seguito a danni permanenti del midollo spinale, in seguito ai quali la vescica ed il muscolo uretrale, sottratti al controllo sovra-spinale del sistema nervoso centrale, si contraggono contemporaneamente provocando un particolare e frequente disturbo funzionale definito dissinergia detrusore-sfintere. Questi disturbi sono presenti tanto negli animali quanto nell'uomo. E' giusto quindi sottolineare come il maiale presenti, a differenza di altri Mammiferi (ad esempio le specie murine) un sistema urinario assimilabile a quello dell'uomo e queste caratteristiche morfo-funzionali lo rendono un ottimo modello sperimentale. Infatti i maiali, presentando parametri urodinamici simili all'uomo, vengono spesso utilizzati come modelli sperimentali urologici in campo umano. Purtroppo, a fronte di approfondite conoscenze riguardanti l'innervazione vescicale delle classiche specie sperimentali (ratto, cavia, topo, gatto) utilizzate in campo urologico, sono veramente insufficienti le informazioni scientifiche relative alla specie suina. Riteniamo che sia compito del Veterinario, ed in particolar modo del morfologo veterinario, cercare di colmare tale *gap* conoscitivo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94: 239–247.
2. Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, S.R., Kimura, H., 1991. Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J Comp Neurol* 306:382-392.
3. Alian, M., Gabella, G., 1996. Decrease and disappearance of intramural neurons in the rat bladder during postnatal development. *Neurosci Lett* 218:1.
4. .
5. Andersson, K.E., 2002. Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 59 (Suppl 5A):43-50
6. Andersson K.E., Schröder A., 2004. Changes in muscarinic receptors of the aging bladder. *Urologe A.* 43:552-556.
7. Andersson, K.E., Wein, A.J., 2004. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev* 56:581–631.
8. Andres, K.H., 1961. Untersuchungen über den Feinbau von Spinal ganglien. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 55:1-48.
9. Apodaca, G., 2004. The Uroepithelium: Not Just a Passive Barrier, *Traffic* 5: 117–128.
10. Applebaum, A.E., Vance, W.H., Coggeshall, R.E., 1980. Segmental localization of sensory cells that innervate the bladder. *J Comp Neurol* 192:203-209.
11. Arrighi, S., Bosi, G., Cremonesi, F., Domeneghini, G., 2008. Immunohistochemical study of the pre- and postnatal innervation of the dog lower urinary tract: morphological aspects at the basis of the consolidation of the micturition reflex *Vet Res Commun* 32:291–304.
12. Bahns, E., Halsband, U., Jänig, W., 1987. Responses of sacral visceral afferents from the lower urinary tract, colon and anus to mechanical stimulation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 410: 296-303.
13. Barone, R., 2003. *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, Vol. IV. *Splanchnologia*. Edagricole, Bologna.

14. Barone, R., 2003. *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, Vol.V. Angiologia. Edagricole, Bologna.
15. Barrington, F.J.F., 1925 The effect of lesions of the hind- and mid-brain on micturition in the cat. *Quart J Exp Physiol Cogn Med* 15:81–102.
16. Barrington, F.J.F., 1928. The central nervous control of micturition. *Brain* 51, 209-220
17. Bennett, D.L.H., Dmietrieva, N., Priestley, J.V., Clary, D., McMahon, S.B., 1996. *trkA*, CGRP and IB4 expression in retrogradely labeled cutaneous and visceral primary sensory neurones in the rat. *Neuroscience Letters* 206:33-36.
18. Bennett, H.L., Gustafsson, J.A., Keast, J.R., 2003. Estrogen receptor expression in lumbosacral dorsal root ganglion cells innervating the female rat urinary bladder. *Auton Neurosci* 105:90-100.
19. Bergman, E., Carlsson, K., Liljeborg, A., Manders, E., Hökfelt, T., Ulfhake, B., 1999. Neuropeptides, nitric oxide synthase and GAP-43 in B4-binding and RT97 immunoreactive primary sensory neurons: Normal distribution pattern and changes after peripheral nerve transaction and aging. *Brain Res* 832:63-83.
20. Birder, L. 2005. More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol*; 289: F489-495.
21. Birder, L., de Groat, W., Mills, I., Morrison, J., Thor, K., Drake, M., 2010 Neural control of the lower urinary tract: peripheral and spinal mechanisms. *Neurourol Urodyn* 29:128-139.
22. Birder, L., Apodaca, G., et al. 1998. Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder. *Am J Physiol*; 275: F226-229
23. Blok, B.F.M., Holstege, G., 1994. Direct projections from the periaqueductal gray to the pontine micturition center (M-region). An anterograde and retrograde tracing study in the cat. *Neuroscience Letters* 166: 93-96.
24. Blok, B.F.M., De Weerd, H., Holstege G., 1995. Ultrastructural evidence for the paucity of projections from the lumbosacral cord to the M region in the cat. A new concept for the organization of the micturiting reflex with the periaqueductal gray as a central relay. *J Comp Neurol* 359:300-309.

25. Blok, B.F.M., Holstege G., 1996. Neuronal control of micturing and its relation to the emoziona motor system. *Progr Brain Res* 107:113-126.
26. Blok, B.F.M., de Weerd, H., Holstege, G., 1997. The pontine micturition center projects to sacral cord GABA immunoreactive neurons in the cat. *Neurosci Lett* 233:109-12.
27. Blok, B.F.M., Holstege, G., 1997. Ultrastructural evidence for a direct pathway from the pontine micturition center to the parasympathetic preganglionic motoneurons of the bladder of the cat. *Neuroscience Letters* 222: 195-198.
28. Blok, B.F.M., Willemsen, T., Holstege, G., 1997. A PET study of brain control of micturition in humans. *Brain*120:111-21.
29. Blok, B.F.M., Holstege, G., 1998. The central nervous system control of micturition in cats and humans. *Behavioural Brain Research* 92: 119-125.
30. Blok, B.F.M., Van Maarseveen, J.T., Holstege, G., 1998. Electrical stimulation of the sacral dorsal gray commissure evokes relaxation of the external urethral sphincter in the cat. *Neurosci Lett* 249: 68–70.
31. Blok, B.F.M., Holstege G., 1999. Two pontine micturition centers in the cat are not interconnected directly: implications for the central organization of micturition. *J Comp Neurol* 403:209-218.
32. Bombardi, C., Grandis, A., Nenzi, A., Giurisato, M., Cozzi, B., 2010. Immunohistochemical localization of substance P And cholecystokinin in the dorsal root ganglia and spinal cord of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Anat Rec (Hoboken)* 293:477-484.
33. Bortolami, R., Callegari, E., Beghella, V., 2004. *Anatomia e Fisologia degli animali domestici*. Edagricole, Bologna 8:326-327.
34. Bossowska, A., Crayton, R., Radziszewski, P., Kmiec, Z., Majewski, M., 2009. Distribution and neurochemical characterization of sensory dorsal root ganglia neurons supplying porcine urinary bladder. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4:77-81.
35. Breedlove, S.M, Arnold, A.P., 1981. Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: response to adult hormone manipulation, absence in androgen insensitive rats. *Brain Research* 225: 297-357.
36. Breedlove, S.M, Arnold, A.P., 1983a. Hormonal control of a developing neuromuscular system I: Complete demasculinisation of the spinal nucleus of the

- bulbocavernous in male rats using the anti-androgen flutamide. *Journal of Neuroscience* 3: 417-423.
37. Breedlove, S.M., Arnold, A.P., 1983b. Hormonal control of a developing neuromuscular system II: Sensitive periods for the androgen induced masculinisation of the rat spinal nucleus of bulbocavernous. *Journal of Neuroscience* 3: 424-432.
  38. Callsen-Cencic, P., Mense, S., 1997. Expression of neuropeptides and nitric oxide synthase in neurones innervating the inflamed rat urinary bladder. *J Auton Nerv Syst* 65:33-44.
  39. Chapple, C.R., Milner, P., Moss, H.E., Burnstock, G. 1992. Loss of sensory neuropeptides in the obstructed human bladder. *Br J Urol* 70:373-381.
  40. Chiochetti, R., Clavenzani, P., Barazzoni, A.M., Grandis, A., Bombardi, C., Lalatta Costaerbosa, G., Petrosino, G., Bortolami, R., 2003. Viscerotopic representation of the subdiaphragmatic tracts of the digestive apparatus within the vagus complex in the Sheep. *Brain Research*, 961:32-44.
  41. Chiochetti, R., Bombardi, C., Grandis, A., Mazzuoli, G., Gentile, A., Pisoni, L., Joechler, M., Lucchi, M.L., 2006. The cattle red nucleus. Cytoarchitecture, morphology and lower spinal cord projections. *American Journal Veterinary Research*, 67:1662-1669.
  42. Cockayne, D.A., Hamilton, S.G., Zhu, Q-M, et al., 2000. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behavior in P2X3-deficient mice. *Nature* 407: 1011-1015.
  43. Conzen, M.A., Sollmann, H. 1982. Reinnervation of the urinary bladder after microsurgical reconstruction of transected caudal fibres. An experimental study in pigs. *Urol Res* 10:141-144.
  44. Craggs, M.D., Rushton, D.N., Stephenson, J.D., 1986. A putative non-cholinergic mechanism in urinary bladders of New but not Old World primates. *Journal of Urology* 136: 1348-1350.
  45. Crowe, R., Haven, A.J., Burnstock, G., 1986. Intramural neurons of the guinea-pig urinary bladder: histochemical localization of putative neurotransmitters in cultures and newborn animals. *J Auton Nerv Syst* 15: 319-339.

46. Crowe, R., Burnstock, G., 1989. A histochemical and immunohistochemical study of the autonomic innervation of the lower urinary tract of the female pig. Is the pig a good model for the human bladder and urethra? *J Urol*.141:414-22.
47. Dalmose, A.L., Hvistendahl, J.J., Olsen, L.H., Eskild-Jensen, A., Djurhuus, J.C., Swindle, M.M., 2000. Surgically induced urologic models in swine. *J Invest Surg* 13:133–145.
48. Dalmose, A.L., Bjarkam, C.R., Djurhuus, J.C., 2004. Stereotactic electrical stimulation of the pontine micturition centre in the pig. *BJU International* 6 :886-889.
49. Davidson, R.A., McCloskey, K.D., 2005. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons. *J Urol* 173:1385–1390.
50. de Groat, W.C., 1971. Excitation and inhibition of sacral parasympathetic neurons by visceral and cutaneous stimuli in the cat. *Brain Research* 33: 499-503.
51. de Groat, W.C., 1975. Nervous control of the urinary bladder of the cat. *Brain Research* 87: 201-211.
52. de Groat, W.C., 1993. Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Urologic Clinics of North America* 20: 383-401.
53. de Groat, W.C., 1997. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* 50: 36-52.
54. de Groat, W.C., 2006. Integrative control of the lower urinary tract:preclinical perspective. *British Journal of Pharmacology* 147: S25–S40.
55. de Groat, W.C. Lalley, P.M., 1972. Reflex firing in the lumbar sympathetic outflow to activation of vesical afferent fibres. *Journal of Physiology* 226: 289-309.
56. de Groat, W.C., Araki, I., Vizzard, M.A., Yoshiyama, M., Yoshimura M., Sugaya, K., Tai, C., Roppolo, J.R., 1998. Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway, *Behav. Brain Res.* 92: 127– 140.
57. de Groat, W.C., Booth, A.M., 1980. Inhibition and facilitation in parasympathetic ganglia of the urinary bladder. *Federation Proceedings* 39: 2990-2996.
58. de Groat, W.C., Yoshimura, N. 2009. Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. *Handb Exp Pharmacol* 194:91-138.

59. Ding, Y.Q., Zheng, H.X., Gong, L.W., Lu, Y., Zhao, H., Qin, B.Z., 1997. Direct projections from the lumbosacral spinal cord to Barrington's nucleus in the rat: a special reference to micturition reflex. *Journal of Comparative Neurology* 389: 149-160.
60. Duce, I.R., Keen, P., 1977. An ultrastructural classification of the neuronal cell bodies of the rat dorsal root ganglion using zinc iodide-osmium impregnation. *Cell Tiss Res* 185:263-277.
61. Edvardsen, P., 1968. Nervous control of urinary bladder in cats: The collecting phase. *Acta Physiologica Scandinavica* 72: 157-171.
62. Elbadawi, A., 1996. Functional anatomy of the organs of micturition. *Urologic Clinics of North America* 23: 177-210.
63. Evans, J.P. 1936. Observations on the nerves of supply to the bladder and urethra of the cat, with a study of their action potentials. *J Physiol* 86:396-414.
64. Feher, E., Csanyi, K., Vajda, J., 1979. Ultrastructure of the nerve cells and fibres in the urinary bladder wall of the cat. *Acta Anat (Basel)* 103: 109-118.
65. Fehér, E., Vajda, J., 1981. Sympathetic innervation of the urinary bladder. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 29:27-35.
66. Freguson, D.R., Kennedy, I., et al., 1997. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by Hydrostatic pressure changes-a possible sensory mechanism? *J Physiol*; 505(2): 503-511.
67. Firth, J. A., Hicks, R. M., 1973. *Journal of Anatomy* 116: 31-43.
68. Firth, J. A., Hicks, R. M., 1973. *Journal of Anatomy*. 113: 95-107.
69. Forger, N., Breedlove, S. M., 1986. Sexual dimorphism in human and canine spinal cord: role of early androgen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: 7527-7531.
70. Gabella, G., 1990. Intramural neurones in the urinary bladder of the guinea pig. *Cell Tissue Res* 261:231-237.
71. Gabella, G., Davis, C., 1998. Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol* 27:141-155.
72. Gerke, M.B., Plenderleith, M.B. 2002. Analysis of the Distribution of Binding Sites for the Plant Lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-Isolectin B4 on Primary Sensory Neurones in Seven Mammalian Species. *Anat Rec* 268:105-114.

73. Gillespie I., Van Ittersum, M., de Vente J., 2005. Expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and nitric-oxide-induced change in cGM in the urothelial layer of the guinea pig bladder. *Cell Tissue Res.* 321: 341-351
74. Gillespie I., Van Ittersum, M., de Vente J., 2006. Sensory collaterals, intramural ganglia and motor nerves in the guinea-pig bladder: evidence for intramural neural circuits. *Cell Tissue Res* 325: 33–45.
75. Gilpin, C.J., Dixon, J.S., Gilpin, S.A., Gosling, J.A., 1983. The fine structure of autonomic neurones in the wall of the human urinary bladder. *J Anat* 137:705–713.
76. Gjone, R., 1966. Excitatory and inhibitory bladder responses to stimulation of 'limbic', diencephalic and mesencephalic structures in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 66: 91-102.
77. Gjone, R., Setekleiv, J., 1963. Excitatory and inhibitory bladder responses to stimulation of the cerebral cortex in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 59: 337-348.
78. Greenland, J.E., Dass, N., Brading, A.F., 1996. Intrinsic urethral closure mechanisms in the female pig. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 179:75-80.
79. Griffiths, D., Holstege, G., De Wall, H., Dalm E., 1990. Control and coordination of bladder and urethral function in the brain stem of the cat. *Neurolo Urodyn* 9:63-82.
80. Guillery, R.W., 2002. On Counting and Counting Errors. *J Comp Neurol* 447:1-7.
81. Hamberger, B., Norberg, K.A., Ungerstedt, U., 1965. Adrenergic synaptic terminals in autonomic ganglia. *Acta Physiol Scand* 64: 285-286.
82. Hicks, R. M., 1965. *J. Cell Biol.* 26: 25-48.
83. Holmgren, S., Jensen, J., 2001. Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Res Bull* 55:723-35.
84. Holstege, G., 2005. Micturition and the soul. *J Comp Neurol.* 493:15-20.
85. Holstege, G., 2010. The Emotional Motor System and Micturition Control. *Neurourology and Urodynamics* 29:42–48.
86. Holstege, G., Griffiths, D., De Wall, H., Dalm, E., 1986. Anatomical and physiological observations on supraspinal control of bladder and urethral sphincter muscle in the cat. *J Comp Neurol* 250:449-461.

87. Holstege, G., Kuypers, H.G., Boer, R.C., 1979. Anatomical evidence for direct brain stem projections to the somatic motoneuronal cell groups and autonomic preganglionic cell groups in cat spinal cord. *Brain Res* 171:329–333.
88. Holstege, G., Tan, J., 1987. Supraspinal control of motoneurons innervating the striated muscles of the pelvic floor including urethral and anal sphincters in the cat. *Brain* 110: 1323-1344.
89. Hu, J., Chin, C.M., Png, J.C., Ng, Y.K., Ling, E.A., 2004. The effect of chronic bladder outlet obstruction on neuronal nitric oxide synthase expression in the intramural ganglia of the guinea pig bladder. *J Urol.* 172:1160-5.
90. Iggo, A., 1955. Tension receptors in the stomach and the urinary bladder. *Journal of Physiology* 128: 593-607.
91. Jensen, N.K., Deding, D., Sorensen, J.C., Bjarkam, C.R., 2009. Long-term implantation of deep brain stimulation electrodes in the pontine micturition centre of the Göttingen minipig. *Acta Neurochir* 151:785-794.
92. Jezernik, S., Wen, J.G., Rijkhoff, N.J., Djurhuus, J.C., Sinkjaer, T. 2000. Analysis of bladder related nerve cuff electrode recordings from preganglionic pelvic nerve and sacral roots in pigs. *J Urol* 163:1309-1314.
93. Jiang, C.H., Lindström, S., Mazières, L., 1991. Segmental inhibitory control of ascending sensory information from bladder mechanoreceptors in cat. *Neurology and Urodynamics* 10: 286-288.
94. Kai-Kai, M.A., 1989. Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat. *Comp Biochem Physiol* 93A:183-193.
95. Kanai, A., Andersson, K.E. 2010. Bladder afferent signaling: recent findings. *J Urol* 183:1288-1295.
96. Kashiba, H., Fukui, H., Morikawa, Y., Senba, E., 1999. Gene expression of histamine H1 receptor in guinea pig primary sensory neurons: a relationship between H1 receptor mRNA-expressing neurons and peptidergic neurons. *Mol Brain Res* 66:24-34.
97. Kawamura, J., Dyck, E. J., 1978. Evidence for 3 populations by size in L5 spinal ganglion in man. *J Neuropath Exp Neurol* 37:269-272.

98. Keast, J.R., de Groat, W.C. 1992. Segmental Distribution and Peptide Content of Primary Afferent Neurons Innervating the Urogenital Organs and Colon of Male Rats. *J Comp Neurol* 319:615-623.
99. Koss, L. G., 1969. *Lab. Znuessf.* 21: 154-168.
100. Krstic, R.V., 2004. *Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology.* Hardcover Kruse, M.N., Mallory, B.S., Noto, H., Roppolo, J.R., de Groat, W.C., 1992. Modulation of the spinobulbospinal micturition reflex pathways in cats. *Am J Physiol* 262:R478-R484.
101. Kuipers, R., Mouton, L.J., Holstege, G., 2005. Afferent projections to the pontine micturition center or Barrington's nucleus in the cat. *J Comp Neurol* (submitted).
102. Kuntz, A., Moseley, R.L., 1936. An experimental analysis of the pelvic autonomic ganglia in the cat. *J. comp. Neurol.* 4:63-75.
103. Kuo, D.C., Hisamitsu, T., de Groat, W.C., 1984. A sympathetic projection from sacral paravertebral ganglia to the pelvic nerve and to postganglionic nerves on the surface of the urinary bladder and large intestine of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 226: 76-86.
104. Kuru, M., 1965. Nervous control of micturition. *Physiological Reviews* 27: 425-494.
105. Kutzenberger, J., Domurath, B., Sauerwein, D., 2005. Spastic bladder and spinal cord injury: seventeen years of experience with sacral deafferentation and implantation of an anterior root stimulator. *Artif Organs* 29:239-241.
106. Kuzuhara, S., Kanayawa, I., Nakanishi, T., 1980. Topographical localisation of the Onuf's nuclear neurons innervating the rectal and vesical striated sphincter muscles: a retrograde fluorescent double labelling in cat and dog. *Neuroscience Letters*, 16: 12-130.
107. Langworthy, O., 1965. Innervation of the pelvic organs of the rat. *Invest Urol* 2:491.
108. Lasanen, L.T., Tammela, T.L., Liesi, P., Waris, T., Polak, J.M. 1992. The effect of acute distension on vasoactive intestinal polypeptide (VIP), neuropeptide Y (NPY) and substance P (SP) immunoreactive nerves in the female rat urinary bladder. *Urol Res* 20:259-263.

109. Lawson, S.N., 1979. The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size. *J Neurocytol* 8:275-294.
110. Lawson, S.N., Harper, A.A., Harper, E.I., Garson, J.A., Anderton, B.H. 1984. A Monoclonal Antibody Against Neurofilament Protein Specifically Labels a Subpopulation of Rat Sensory Neurones. *J Comp Neurol* 228:263-272.
111. Lawson, S.N., Perry, M.J., Prabhakar, E., McCarthy, P.W. 1993. Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. *Brain Res Bull* 30:239-243.
112. Lawson, S.N., 1995. Neuropeptides in morphologically and functionally identified primary afferent neurons in dorsal root ganglia: substance P, CGRP and somatostatin. *Progr Brain Res* 104:161-173.
113. Levi, G., 1908. I gangli cerebrospinali. Studi di istologia comparata e di istogenesi. *Archivio italiano di Anatomia e di Embriologia* 7 (suppl):1-392.
114. Levi, P. E., Cowan, D. M., Cooper, E., 1969. *Cell and Tissue Kinetics* 2: 249–262.
115. Lewis, S., de Moura, J., 1984. Apical membrane area of rabbit urinary bladder increases by fusion of intracellular vesicle: an electrophysiological study. *J Membr Biol* 82: 123-136
116. Lewis, S.A., Lewis J.R., 2006. Kinetics of urothelial ATP release. *Am J physiol*; 291: F332-340.
117. Lindström, S., Fall, M., Carlsson, C.A., Erlandson, B.E., 1984. Rhythmic activity in pelvic efferents to the bladder: an experimental study in the cat with reference to the clinical condition 'unstable bladder'. *Urologia Internationalis* 39: 272-279.
118. Lindström, S., Mazieres, L., 1991. Effect of menthol on the bladder cooling reflex in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 141: 1-10.
119. Luber-Narod, J., Austin-Ritchie, T., Hollins, C. 3rd, Menon, M., Malhotra, R.K., Baker, S., Carraway, R.E., 1997. Role of substance P in several models of bladder inflammation. *Urol Res* 25:395-399.
120. Lukáčová, N., Kolesár, D., Marsala, M., Marsala, J., 2006. Immunohistochemical, histochemical and radioassay analysis of nitric oxide synthase immunoreactivity

- in the lumbar and sacral dorsal root ganglia of the dog. *Cell Mol Neurobiol* 26:17-44.
121. Mallory, B., Steers, W.D., de Groat, W.C., 1989. Electrophysiological study of micturition reflexes in rats. *American Journal of Physiology* 257: R410-R421.
122. Mannen, T., 1991. Neuropathology of Onuf's nucleus. *Rinsho Shinkeigaku* 31:1281-1285.
123. Mannen, T., Iwata, M., Toyokura, Y., Nagashima, K., 1977. Preservation of a certain motoneuron group of the sacral spinal cord in amyotrophic sclerosis : its clinical significance. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 40: 464-469.
124. Martin, B. F., 1972. *Journal of Anatomy* 112: 433-455.
125. Matsumoto, G., Hisamitsu, T., and de Groat, W.C., 1995. Role of glutamate and NMDA receptors in the descending limb of the spinobulbospinal micturition reflex pathway of the rat. *Neurosci Lett* 183:58-61.
126. Mazzuoli, G., Klaus, M., Kuch, B., Chiocchetti, R., Lucchi, M.L., Schemann, M., 2007. Mechanosensitivity in the gut with neuro imaging technique. *GISN, Accademia delle Scienze, Bologna, 23 novembre 2007.*
127. McGaedy, T.A., Quinn, P.J., FitzPatrick, E.S., Ryan, M.T. 2006. *Veterinary Embryology, Urinary System, pag. 240.*
128. Messier, B., Le Blonde, C. P., 1960. *American Journal of Anatomy* 106: 247-261.
129. Michel, M.C., Vrydag, W., 2006. Alfa1, Alfa2- and Beta -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147:S88-S119.
- 130..
131. Morgan, C., Nadelhaft, I., De Groat, W.C., 1981. The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer's tract and the spinal gray matter and his relationship to the sacral parasympatetic nucleus. *J Comp Neur* 201:415-440.
132. Moseley, R.L., 1936. Preganglionc connections of the intramural ganglia of the urinary bladder. *Proc. Soc . exp. Biol. Med.* 34:728-730.
133. Mukerji, G., Waters, J., Chessell, I.P., Bountra, C., Agarwal, S.K., Anand, P., 2006. Pain during ice water test distinguishes clinical bladder hypersensitivity from overactivity disorders. *BMC Urol.* 6:31.

134. Nadelhaft, I., Vera, P., 1996. Neurons in the Rat Brain and Spinal Cord Labeled After Pseudorabies Virus Injected Into the External Urethral Sphincter. *The Journal of comparative Neurology* 375:502-517.
135. Nadelhaft, I., Vera, P.L., 1991. Conduction velocity distribution of afferent fibers in the female rat hypogastric nerve. *Brain Res* 539:228-232.
136. Nagashima, T., Beppu M., Uono, M., Yamada, H., 1979. Demonstration of neuronal localisation of Onufrowicz's cell group X in rabbit by double labelling method. *Acta Histochemica et Cytochemica* 12:369-391.
137. Nieberle, Cohrs, 1967. Textbook of the special pathological anatomy of domestic animals. Pergamon press 717-718.
138. Onufrowicz, B., 1889. Notes on the arrangement and function of the cell groups in the sacral region of the spinal cord. *Journal of Nervous and Mental Disorders* 26:498-504.
139. Onufrowicz, B., 1890. On the arrangement and function of the cell groups of the sacral region of the sacral spinal cord in man. *Archives of Neurology and Psychopathology* 3: 387-411.
140. Parsons, C. F., Stauffer, C., Schmidt, J. D., 1980. *Science* 208: 605-607.
141. Persson, K., Alm, P., Johansson, K., Larsson, B., Andersson, K.E. 1993. Nitric oxide synthase in pig lower urinary tract: immunohistochemistry, NADPH diaphorase histochemistry and functional effects. *Br J Pharmacol* 110:521-530.
142. Persson, K., Alm, P., Johansson, K., Larsson, B., Andersson, K.E., 1995. Co-existence of nitrenergic, peptidergic and acetylcholine esterase-positive nerves in the pig lower urinary tract. *J Auton Nerv Syst* 52: 225-236.
143. Persson, K., Andersson, K.E., 1992. Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract. *Br J Pharmacol* 106:416-422.
144. Petzold, A., 2005. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 233:183-198.
145. Pidsudko, Z., 2004. Distribution and chemical coding of neurons in intramural ganglia of the porcine urinary bladder trigone. *folia histochemica et cytobiologica* Vol. 42, N°. 1.
146. Plenderleith, M.B., Cameron, A.A., Key, B., Snow, P.J. 1989. The plant lectin soybean agglutinin binds to the soma, axon and central terminals of a

- subpopulation of small-diameter primary sensory neurons in the rat and cat. *Neuroscience* 31:683-695.
147. Popesko, P., 2004. Atlante di anatomia topografica degli animali domestici, Vol.II-III. Edimediche.
148. Porter, K. R., Bonneville, M. A., 1963. An Introduction to the Fine Structure of the cells. *Histochem J* 26:127-33.
149. Price, T.J., Flores, C.M. 2007. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J Pain* 8:263-272.
150. Prieto, D., Benedito, S., Rodrigo, J., Martinez, M.R., Garcia, S.A., 1989. Distribution and density of neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibres and cells in the horse urinary bladder. *J Auton Nerv Syst* 27: 173-180.
151. Purinton, P.T., Fletcher, T.F., Bradley, W.E., 1973. Gross and light microscopic features of the pelvic plexus in the rat. *Anatomical Record* 175:697-705.
152. Roppolo, J.R., Nadelhaft, I., de Groat, W.C., 1985. The organization of pudendal motoneurons and primary afferent projections in the spinal cord of the Rhesus monkey revealed by horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology* 243: 475-488.
153. Russo, D., Clavanzani, P., Mazzoni, M., Chiocchetti, R., Di Guardo, G., Lalatta-Costerbosa, G., 2010a. Immunohistochemical characterization of TH13-L2 spinal ganglia neurons in sheep (*Ovis aries*). *Microsc Res Tech* 73:128-139.
154. Russo, D., Bombardi, C., Grandis, A., Furness, J.B., Spadari, A., Bernardini, C., Chiocchetti, R., 2010b. Sympathetic innervation of the ileocecal junction in horses. *J Comp Neurol* 518:4046-4066.
155. Russo D, Bombardi C, Castellani G, Chiocchetti R. 2010c. Characterization of Spinal Ganglion Neurons in Horse (*Equus caballus*). A Morphometric, Neurochemical and Tracing Study *Neuroscience* 176:53-71. (IF2011: 3.380)
156. Russo D, Castellani G, Chiocchetti R. 2010d. Expression of High-Molecular-Mass Neurofilament Protein in Horse (*Equus caballus*) Spinal Ganglion Neurons. *Submitted to Brain Research* (ottobre 2010). *Microsc Res Tech.* 2012 75(5):626-37 (IF 2012: 1.593)

- 157.Sasaki, M., 2004. Feed-forward and feedback regulation of bladder contractility by Barrington's nucleus in cats, *J. Physiol.* 557: 287–305.
- 158.Sasaki, M., 2005. Properties of Barrington's neurons in cats: units that fire inversely with micturition contraction. *Brain Res* 1033:41–50.
- 159.Sasaki, M., Murayama, S., 1993. A one structural study of Onuf's nucleus in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 119:28-37.
- 160.Sato M, Mizuno M, Konishi, A., 1978. A localisation of motoneurons innervating perineal muscles: a HRP study in cat. *Brain Research* 140:149-154.
- 161.Schroder, H.D., 1981. Onuf's nucleus X: a morphological study of a human spinal nucleus. *Anatomy and Embryology* 162:443-453.
- 162.Sie, JA., Blok, BFM., de Weerd H., Holstege G., 2001. Ultrastructural evidence for direct projections from the pontine micturition center to glycine-immunoreactive neurons in the sacral dorsal gray commissure in the cat. *J Comp Neurol* 429:631–637.
- 163.Smet, P.J., Moore, K.H., Jonavicius, J., 1997. Distribution and colocalization of calcitonin gene-related peptide, tachykinins, and vasoactive intestinal peptide in normal and idiopathic unstable human urinary bladder. *Lab Invest* 77:37–49.
- 164.Su, H.C., Wharton, J., Polak, J.M., Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., Gibson, S.J., Terenghi, G., Morrison, J.F., Ballesta, J., Bloom, S.R., 1986. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in afferent neurons supplying the urinary tract: combined retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neuroscience* 18:727-747.
- 165.Sugaya, K., Nishijima, S., Miyazato, M., Ogawa, T., 2005. Central nervous control of micturition and urine storage. *J. Smooth Muscle Res.* 41:117–132.
- 166.Sugaya, K., Ogawa, Y., Hatano, T., Nishijima, S., Matsuyama, K., Mori, S., 2003. Ascending and descending brainstem neuronal activity during cystometry in decerebrate cats. *Neurourol Urodyn* 22:343–350.
- 167.Sung, J.H., Mastri, A.E., Segal, E., 1979. Pathology of Shy-Drager syndrome. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 38: 353-368.
- 168.Tan, L.L., Bornstein, J.C., Anderson, C.R., 2008. Distinct chemical classes of medium-sized transient receptor potential channel vanilloid 1-immunoreactive

- dorsal root ganglion neurons innervate the adult mouse jejunum and colon. *Neuroscience* 156:334-343.
169. Tanaka, Y., Koyama, Y., Kayama, Y., Kawauchi A., Ukimura, O., Miki, T., 2003. Firing of micturition center neurons in the rat mesopontine tegmentum during bladder contraction. *Brain Res* 965:146–154.
170. Thor, K.B., Morgan, C., Nadelhaft, I., Houston, M., de Groat, W.C., 1989. Organisation of afferent and efferent pathways in the pudendal nerve of the female cat. *Journal of Comparative Neurology* 288:263-279.
171. Truschel, S.T., Wang, E., Ruiz, W.G. et al., 2002. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*; 13: 830-846
172. Torrens, M., Morrison, J.F.B., 1987. *The physiology of the lower urinary tract.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
173. Uckert, S., Stief, C.G., Lietz, B., Burmester, M., Jonas, U., Machtens, S.A., 2002. Possible role of bioactive peptides in the regulation of human detrusor smooth muscle - functional effects in vitro and immunohistochemical presence. *World J Urol* 20:244-249.
174. Uemura, E., Fletcher, T.F., Bradley, W.E., 1975. Distribution of lumbar and sacral afferent axons in submucosa of cat urinary bladder. *Anat Rec* 183:579-587.
175. Uvelius B., Gabella, G., 1998. The distribution of intramural nerves in urinary bladder after partial denervation in the female rat. *Urol Res.* 26:291-297.
176. Vera, P.L., Nadelhaft, I., 1990. Conduction velocity distribution of afferent fibers innervating the rat urinary bladder. *Brain Research* 520: 83-89.
177. Vera, P.L., Nadelhaft, I., 1992. Afferent and sympathetic innervation of the dome and the base of the urinary bladder of the female rat. *Brain Res Bull* 29:651-658.
178. Veranic, P., Jezernik, K., 2000. The response of junctional complexes to induced desquamation in muose bladder urothelium. *Biol Cell*; 92: 105-113
179. Vizzard, M.A., 2001. Alterations in neuropeptide expression in lumbosacral bladder pathways following chronic cystitis. *J Chem Neuroanat* 21:125-138.
180. Vizzard, M.A., Brisson, M., de Groat, W.C., 2000. Transneuronal labeling of neurons in the adult rat central nervous system following inoculation of pseudorabies virus into the colon. *Cell Tissue Res* 299:9–26.
181. Walker, B.E., 1960. *Journal of Ultrastructural Research* 3: 346-361.

182. Wang, H.F., Robertson, B., Grant, G., 1998. Anterograde transport of horseradish-peroxidase conjugated isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I in spinal primary sensory neurons of the rat. *Brain Res* 811:34-39.
183. Wang, E., Lee J-M, Johnson J.P. et al., 2003. Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium. *Am J Physiol*; 285: F651-663.
184. Wang, E., Lee J-M, et al., 2005. ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest*; 115: 2412-2422.
185. Weissner, W., Winterson, B.J., Stuart-Tilley, A., Devor, M., Bove, G.M., 2006. Time Course of Substance P Expression in Dorsal Root Ganglia Following Complete Spinal Nerve Transection. *J Comp Neurol* 497:78-87.
186. Wen, J., Morrison, J.F., 1995. The effects of high urinary potassium concentration on pelvic nerve mechanoreceptors and 'silent' afferents from the rat bladder. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 385: 237-239.
187. Werkström, V., Alm, P., Persson, K., Andersson, K.E., 1998. Inhibitory innervation of the guinea-pig urethra; roles of CO, NO and VIP. *J Auton Nerv Syst.* 74:33-42.
188. Willette, RN., Morrison, S., Sapru, Reis, D.J., 1988. Stimulation of opiate receptors in the dorsal pontine tegmentum inhibits reflex contraction of the urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 244:403-409.
189. Wu, X.R., Lin, J.H., Walzg, T., Hiinerg, M., Yus, J., Aebis, U., Tien, T., Sun, S., 1994. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *The Journal of biological chemistry* Vol. 269, No. 18 pp. 13716-13724.
190. Wu, X.R., Manabe M., Yu J., Sun, T., 1990. *J. Bid. Chem.* 286:191-7.
191. Yoshimura, N., de Groat, W.C., 1997. Neural control of the lower urinary tract. *International Journal of Urology* 4:111-125.
192. Yoshimura, N., Erdman, S.L., Snider, M.W., de Groat, W.C., 1998. Effects of spinal cord injury on neurofilament immunoreactivity and capsaicin sensitivity in rat dorsal root ganglion neurons innervating the urinary bladder. *Neuroscience* 83:633-643.
193. Yoshimura, N., Seki, S., Erickson, K.A., Erickson, V.L., Hancellor, M.B., de Groat, W.C., 2003. Histological and electrical properties of rat dorsal root ganglion neurons innervating the lower urinary tract. *J Neurosci* 23:4355-4361.

194. Yoshimura, N., Kaiho, Y., Miyazato, M., Yunoki, T., Tai, C., Chancellor, M.B., Tyagi, P., 2008. Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377:437–448.
195. Yu W., Zacharia L.C, et al. 2006. Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. *Am J Physiol*; 291:C254-265.
196. Zermann, D.H., Ishigooka, M., Doggweiler, R., Schmidt, R. A., 1998. Central autonomic innervation of the lower urinary tract - a neuroanatomy study *World J Urol* 16: 417-422.
197. Zhang, X., Verge, V., Wiesenfeld-Hallin, Z., Ju, G., Bredt, D., Synder, S.H., Hökfelt, T., 1993. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335:563-575.
198. Zvarova, K., Vizzard, M.A., 2006. Changes in galanin immunoreactivity in rat micturition reflex pathways after cyclophosphamide-induced cystitis. *Cell Tissue Res* 324:213-224.
199. Zwick, M., Davis, B.M., Woodbury, J., Burkett, J.N., Koerber, H.R., Simpson, J.F., Albers, K.M. 2002. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *J Neurosci* 22:4057-4065.