

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
Morfofisiologia veterinaria e applicazioni biotecnologiche

Ciclo XXIII

Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: DiMorFiPa

ASPETTI FISIOPATOLOGICI DELLA PROSTATA DI CANE

Presentata da: Dott.ssa Ramona Raccagni

Coordinatore Dottorato

Prof. Eraldo Seren

Relatore

Prof. Eraldo Seren

Correlatore

Prof. Daniele Zambelli

Esame finale anno 2011

INTRODUZIONE.....	4
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE ALLA ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA DELLA PROSTATA.....	6
1.1 Anatomia della prostata.....	6
1.1.1 Cenni di anatomia della prostata di cane.....	6
1.1.2 Cenni di anatomia della prostata di uomo.....	10
1.2 Fisiologia della prostata.....	13
1.3 Cenni di fisiopatologia della prostata.....	17
1.3.1 L'iperplasia prostatica benigna (IPB).....	19
CAPITOLO 2 ASPETTI BIOCHIMICI DELLA PROSTATA.....	22
2.1 Il plasma seminale.....	22
2.2 Il secreto prostatico.....	25
2.2.1 Profilo proteico del plasma seminale.....	27
2.2.2 L'arginina esterasi.....	29
2.2.3 Lo zinco (Zn).....	31
CAPITOLO 3 ASPETTI CLINICI DELLA PROSTATA DI CANE.....	34
3.1 La palpazione.....	34
3.2 La radiografia.....	35
3.3 L'ecografia.....	37
3.3.1 Cenni di ecografia in corso di iperplasia prostatica benigna.....	39
3.4 La biopsia.....	41
CAPITOLO 4 PARTE SPERIMENTALE.....	42
Introduzione.....	42
4.1 Studio 1: Aspetti Clinici.....	43
4.1.1 Materiale e metodi.....	43
4.1.2 Risultati.....	45
4.1.3 Discussione.....	50
4.2 Studio 2: Aspetti Biochimici.....	52
4.2.1 Materiali e metodi.....	52
4.2.2 Risultati.....	70
4.2.3 Discussione.....	86
4.3 Studio 3: Aspetti Ormonali.....	92

4.3.1 Materiali e metodi.....	92
4.3.2 Risultati.....	97
4.3.3 Discussione	98
BIBLIOGRAFIA	100

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'interesse verso le patologie prostatiche è notevolmente aumentato, dato il numero crescente di cane anziani e la presenza di proprietari sempre più scrupolosi, poiché il cane è oramai ritenuto parte integrante della famiglia. Inoltre, per quanto riguarda il settore della riproduzione, lo studio delle patologie prostatiche è molto importante poiché quest'ultime possono compromettere la capacità riproduttiva dei cani maschio, con ripercussioni economiche per gli allevatori. È stato scelto il cane come specie per lo studio della fisiopatologia di tale ghiandola, poiché viene comunemente utilizzato come modello sperimentale per l'uomo, è perché presenta la prostata come unica ghiandola sessuale accessoria, caratteristica che ne facilita l'indagine biochimica.

In letteratura non vi è molto materiale inerente la fisiologia della prostata, inoltre l'eziopatogenesi del più comune processo patologico a carico della ghiandola, l'iperplasia prostatica benigna (IPB), risulta ancora poco chiara ed i metodi diagnostici limitati. Con il termine di iperplasia prostatica benigna (IPB) ci si riferisce ad un aumento uniforme delle dimensioni della prostata dovuto ad un aumento delle dimensioni delle cellule (ipertrofia) e del loro numero (iperplasia) (Gobello *et al.*, 2002). L'IPB è la principale malattia prostatica sia nell'uomo che nel cane, e quest'ultimo è stato più volte utilizzato come modello sperimentale per l'uomo (Isaacs, 1983).

Gli esami collaterali atti a determinare la presenza di IPB, quali la radiologia e l'ecografia, non permettono una diagnosi certa della patologia, per la quale ci si affida all'anamnesi riportata dal proprietario, ad un'analisi dei sintomi ed alla propria esperienza clinica.

I cani esaminati sono stati sottoposti a prelievo di materiale seminale con tecnica manuale, da cui è stato ottenuto, mediante centrifugazione il plasma seminale. L'eiaculato è composto da spermatozoi e da una componente liquida, denominata appunto plasma seminale, atta a fornire un ambiente adeguato al mantenimento della vitalità e della motilità degli spermatozoi nel tratto genitale femminile (Dellman *et al.*, 1994).

Dal punto di vista dell'analisi biochimica, il plasma seminale di cani sani è stato sottoposto a diverse indagini allo scopo di determinarne il profilo proteico standard, per poi compararlo con quello ottenuto dall'analisi del plasma seminale di cani affetti da IPB, al fine di identificare eventuali marker di patologia prostatica. È stato inoltre eseguito un confronto fra il profilo dello zinco di cani sani e di cani affetti da IPB, per valutare se la metodica potesse risultare d'aiuto a fini diagnostici.

In particolare è stata eseguita l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (*SDS-PAGE*), la determinazione delle proteine totali ed il dosaggio dello zinco con spettrofotometria ad assorbimento atomico su frazioni di plasma seminale eluite in cromatografia.

Dal punto di vista clinico, è stato valutato l'accrescimento della prostata all'esame ecografico in cuccioli a partire dai 4 giorni di vita ai 13 mesi d'età. In letteratura non è presente alcun lavoro riferibile a quello eseguito.

Infine, dal punto di vista ormonale, tutti i cani esaminati sono stati sottoposti a prelievo di sangue per il dosaggio degli ormoni testosterone (TST), progesterone (P4) ed estradiolo (E2), sempre con lo scopo di evidenziare eventuali differenze fra cani sani e cani affetti da IPB.

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE ALLA ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA DELLA PROSTATA

1.1 Anatomia della prostata

1.1.1 Cenni di anatomia della prostata di cane

La prostata è la sola ghiandola sessuale accessoria dell'apparato genitale maschile del cane. Si presenta come un organo impari, ovoidale e globoso, che circonda interamente il tratto iniziale dell'uretra e la parte adiacente del collo della vescica (Johnston *et al.*, 2000). A seconda delle dimensioni, la prostata può localizzarsi in cavità pelvica od addominale (Barone, 1994). Fino alla pubertà la prostata è situata in cavità pelvica; successivamente il suo graduale incremento di volume, correlato all'accrescersi dell'età dell'animale, determina uno spostamento graduale dell'organo dalla cavità pelvica alla cavità addominale (O'Shea, 1962). In un cane di 4 anni infatti, la prostata è situata in cavità addominale per circa la metà della sua estensione, mentre a 10 anni è interamente addominale (Basinger, 2003). Dagli 11 anni d'età si osserva una fisiologica tendenza all'atrofia dell'organo con conseguente diminuzione del suo volume (Johnston *et al.*, 2001). Le dimensioni normali della prostata, misurate in cani di circa 10 kg di peso e d'età compresa fra i 2 ed i 5 anni, sono di 2.6 cm (diametro trasverso) x 0.8 cm (diametro dorsoventrale) per 1.7 cm (lunghezza) (Christensen, 1964).

Cranialmente la prostata contrae rapporto diretto con la vescica, dorsalmente è separata dal retto dal setto retto-genitale e da una banda di tessuto connettivo, ventralmente è ricoperta da tessuto adiposo confinante con la sinfisi pubica, infine lateralmente si rapporta con le pareti addominali (Smith, 2008). L'uretra attraversa la ghiandola passando al centro di essa od in posizione dorsale eccentrica (Busoni, 2007).

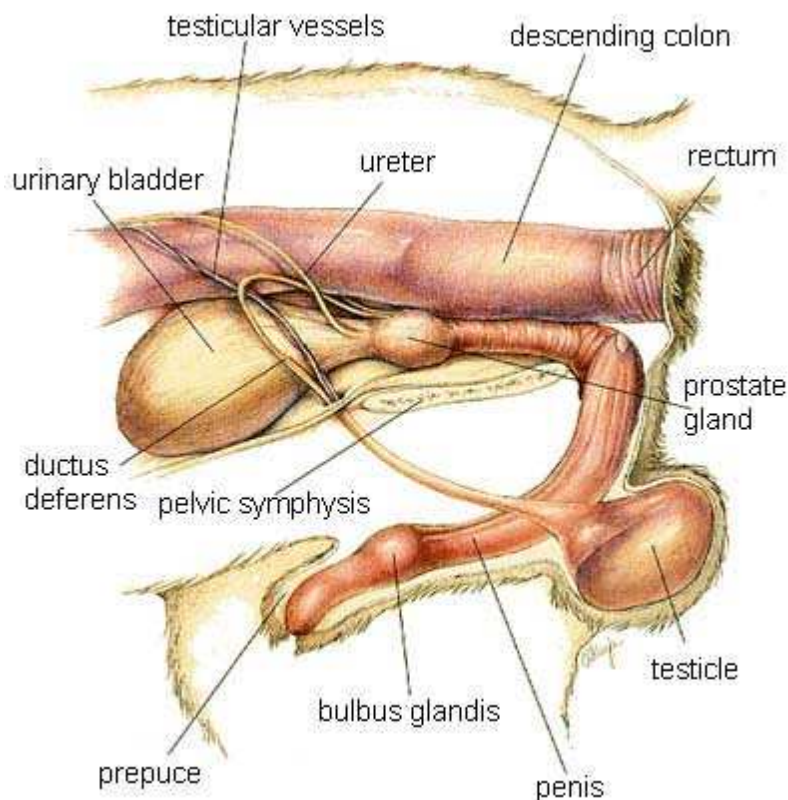


Figura 1.1: Anatomia dell'apparato genitale maschile di cane

Nel cane l'aspetto tipicamente bilobato della prostata, deriva dalla presenza, sulla faccia sia dorsale che ventrale, di un solco mediano che separa l'organo in due lobi (*Lobi prostatae*), il destro ed il sinistro (Smith, 2008). La prostata si compone di una porzione più compatta, denominata "corpo" della prostata (*Corpus prostatae*), e di una porzione "disseminata" (*Pars disseminata prostatae*) rappresentata da lobuli distribuiti lungo il corso dell'uretra. Nel cane il corpo della prostata è molto voluminoso mentre la porzione disseminata è ridotta a pochi lobuli sparsi. Tali lobuli sono situati nella parete dell'uretra membranosa tra lo strato spongioso e il muscolo uretrale (Barone, 1994).

Il corpo della prostata è circondato da una capsula fibromuscolare (*Capsula prostatae*) da cui trae origine lo stroma ghiandolare. Lo stroma è un connettivo denso composto da fibroblasti e da numerose cellule muscolari lisce, riunite in fasci diversamente orientati; caratteristica per la quale lo stroma è anche chiamato "sostanza muscolare". I vasi arteriosi e venosi, i linfatici ed i nervi sono contenuti nello stroma prostatico e da esso sostenuti (LeRoy *et al.*, 2009). Dalla capsula si dipartono delle trabecole connettivali, ad andamento convergente verso l'uretra, che formano setti anastomizzati ed incompleti,

suddividendo lo stroma ghiandolare in numerosi lobuli irregolari. Ad ogni lobulo fa capo una ghiandola tubulo-alveolare le cui secrezioni, attraverso piccoli canalicoli prostatici, sboccano in uretra (Barone, 1994; Smith, 2008).

Le ghiandole tubulo-alveolari hanno un lume largo rivestito da un epitelio secernente di spessore variabile da basso e cubico ad alto e prismatico, allocato su una sottile membrana basale (LeRoy *et al.*, 2009). Le cellule dell'epitelio ghiandolare presentano nucleo ovoidale e basale, mentre il citoplasma è caratterizzato dalla presenza di numerosi granuli eosinofili di natura lipidica, indice dell'intensa attività secretoria della cellula. Nel soggetto orchiettomizzato, venendo meno la stimolazione dell'epitelio e delle cellule da parte del testosterone, il primo appare basso, mentre le seconde perdono il loro carattere secernente (Barone, 1994). I condotti escretori rivestiti da epitelio prismatico, confluiscono in canalicoli prostatici più stretti il cui epitelio, con l'avvicinarsi dello sbocco in uretra, diviene progressivamente più simile all'epitelio di transizione dell'uretra stessa (Barone, 1994; Delmann *et al.*, 1994). I canalicoli prostatici sboccano in uretra in prossimità del collicolo seminale, il quale presenta su entrambi i lati l'apertura del dotto deferente (Dyce *et al.*, 2009). I dotti deferenti infatti, in partenza dall'epididimo, penetrano la superficie prostatica in posizione cranio dorsale, e si portano caudoventralmente sboccando nell'uretra prostatica a livello del collicolo seminale (Mattoon, 2002).

Il liquido opalescente secreto dalla prostata viene espulso per contrazione della sostanza muscolare e contribuisce alla prima e terza frazione dell'eiaculato di cane (England *et al.*, 1990).

Arterie e vene

Il corpo della prostata è irrorato da arterie satelliti dell'arteria prostatica, a sua volta branca dell'arteria pudenda interna, mentre l'irrorazione della porzione disseminata deriva dall'arteria uretrale. I rami arteriosi raggiungono dorsolateralmente l'organo, si ramificano sulla sua superficie e penetrano la capsula ghiandolare, seguendo le trabecole connettivali fino attorno ai fondi ciechi ghiandolari, dove terminano in una fitta rete capillare (Barone, 1994). Il ritorno venoso è a carico delle vene prostatiche ed uretrali che si connettono alla vena iliaca interna (Smith, 2008).

Linfatici

I numerosi vasi linfatici si riuniscono in una rete perighiandolare, i cui efferenti si portano ai linfonodi iliaci mediali (Barone, 1994).

Nervi

L'innervazione parasimpatica deriva dal nervo pelvico, in partenza dal plesso pelvico, e stimola la secrezione del fluido prostatico. Il nervo pelvico segue il decorso dell'arteria prostatica fino al plesso pelvico, prima di proiettare fibre verso la ghiandola. L'innervazione simpatica deriva dal nervo ipogastrico e determina la contrazione delle fibre muscolari lisce dello stroma ghiandolare, provocando il conseguente passaggio del fluido prostatico dapprima nei canalicoli prostatici, poi in uretra (Basinger, 2003). La prostata produce continuamente piccole quantità di secreto che viene riversato nella porzione prossimale dell'uretra. In caso di mancata eiaculazione o minzione, il secreto prostatico è spinto nella vescica urinaria dall'elevata pressione uretrale (Dorfman, 1998).

1.1.2 Cenni di anatomia della prostata di uomo

Nell'uomo la prostata si presenta come una ghiandola tubulo-alveolare a forma di tronco di cono, delle dimensioni di circa una castagna e del peso di 20 grammi (Setchell *et al.*, 1994). Come nel cane, la prostata circonda completamente la porzione prossimale dell'uretra; la base della ghiandola è in rapporto con il collo della vescica urinaria, mentre l'apice è localizzato a livello del diaframma urogenitale (Risbridger *et al.*, 2006). L'uretra non attraversa la prostata come una linea retta ma, circa a metà del suo tragitto, fra l'apice della prostata e il collo della vescica, il segmento prossimale dell'uretra disegna un angolo di 35° rispetto al segmento distale della stessa (Markham *et al.*, 1994).

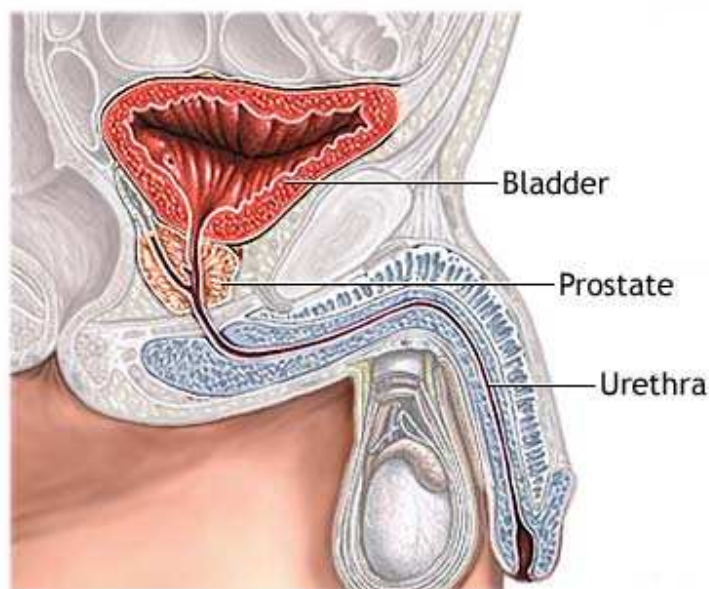


Figura 1.2: Anatomia dell'apparato genitale maschile di uomo

Il parenchima prostatico viene suddiviso in tre regioni seguendo lo schema proposto da McNeal: la zona periferica, la zona centrale, una piccola zona di transizione e la zona preprostatica. La porzione anteriore della prostata è completamente ricoperta da una spessa banda di tessuto connettivo denominata *stroma fibromuscolare anteriore*, mancante di qualsiasi struttura duttale.

La *zona periferica* è quella di estensione maggiore e comprende il 75% del tessuto ghiandolare. È l'area in cui il carcinoma prostatico si sviluppa con frequenza maggiore (Markham *et al.*, 1994).

L'*area centrale* contiene il 25% del tessuto ghiandolare. McNeal differenzia la zona centrale dalla periferica sulla base di diversità a carico della struttura ghiandolare e dell'aspetto citologico, paragonando la zona centrale alle vescichette seminali dal punto di vista istologico. Tale somiglianza spiegherebbe il perché l'area centrale della prostata risulta quella meno soggetta allo sviluppo di carcinomi.

La *zona preprostata* è rappresentata da fibre muscolari lisce, formanti uno sfintere cilindrico attorno all'uretra, la cui funzione è di prevenire il reflusso del liquido seminale in vescica, al momento dell'ejaculazione.

Tale sfintere di fibre muscolari lisce racchiude la piccola *zona di transizione*, denominata anche area periuretrale, che rappresenta solo il 5% del tessuto ghiandolare prostatico (Markham *et al.*, 1994). Seppur di piccole dimensioni, la zona di transizione riveste una notevole importanza poiché è il sito in cui origina l'iperplasia prostatica benigna. (Setchell *et al.*, 1994).

Nell'uomo l'epitelio prostatico è formato principalmente da tre tipologie cellulari: le cellule secretorie, le cellule basali e le cellule neuroendocrine.

Le *cellule secretorie* sono cellule luminali colonnari che secernono proteine nel lume ghiandolare, drenato dai dotti prostatici in uretra. Fra le proteine secrete, le più importanti sono: l'antigene specifico per la prostata (*Prostate-Specific-Antigen, PSA*) e la fosfatasi acida prostatica (*Prostatic Acid Phosphatase, PAP*). Le cellule secretorie sono testosterone-dipendenti; in assenza di tale ormone infatti, perdono il carattere secernente al 90%, divengono cuboidali e presentano diminuzione di peso e dimensioni (Markham *et al.*, 1994). Le cellule secretorie esprimono infatti alti livelli di recettori per gli androgeni (*Androgen Receptors, ARs*).

Le *cellule basali* sono più piccole delle secretorie e meno numerose. Sono cellule rotondeggianti, adagiate sulla membrana basale, incastrate fra le vicine cellule colonnari, prive di attività secernente (Markham *et al.*, 1994).

Le *cellule neuroendocrine* si ritrovano nello strato luminale dell'epitelio di acini e dotti in tutta la prostata, e perfino nell'urotelio della mucosa dell'uretra prostatica. Si contraddistinguono tre tipologie di cellule neuroendocrine, a seconda delle molecole che

producono: quelle più abbondanti che producono serotonina ed ormoni stimolanti la tiroide, quelle producenti calcitonina ed infine quelle che producono somatostatina (Markham *et al.*, 1994).

1.2 Fisiologia della prostata

La prostata è un organo androgeno-dipendente: il suo sviluppo, la sua dimensione e il suo carattere secernente sono preservati dal testosterone (Markham *et al.*, 1994). L'orchietomia causa infatti una significativa atrofia dell'organo, in particolare pari al 50% della sua iniziale estensione a 3 settimane dalla castrazione, e pari al 70% a 9 settimane dalla castrazione (Barsanti *et al.*, 1995).

Già durante la vita fetale, i testicoli producono una sostanza androgenica, il testosterone, che promuove il differenziamento e lo sviluppo degli organi genitali maschili (Bortolami *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2004). In particolare, la produzione prenatale di testosterone mascolinizza il tratto genitale ed i genitali esterni, e promuove la discesa dei testicoli nello scroto. Alla nascita la produzione di testosterone si riduce notevolmente, per poi progressivamente aumentare con l'avvicinarsi del raggiungimento della pubertà (Sherwood *et al.*, 2005). Nell'animale prepubere la prostata si presenta come un piccolo ingrossamento nodulare circondante l'uretra, caratterizzata dalla presenza di dotti sviluppati, alveoli poco evidenti ed abbondante stroma ghiandolare (Brendler *et al.*, 1983).

Con il raggiungimento della maturità sessuale, vi è un incremento della secrezione di testosterone da parte del testicolo. Tale ormone determina la comparsa della pubertà, lo sviluppo ed il mantenimento dei caratteri sessuali secondari quali: il timbro della voce e la distribuzione dei peli (nell'uomo), la calcificazione delle corna (negli animali a riproduzione stagionale), lo sviluppo del pene, dei testicoli stessi e delle ghiandole sessuali accessorie quali la prostata. Il testosterone regola inoltre la spermatogenesi, la maturazione definitiva degli spermatozoi, l'aggressività e la libido (Bortolami *et al.*, 2009). Nel cane sessualmente maturo, l'epitelio prostatico si presenta fortemente sviluppato con alveoli ben definiti, rivestiti da cellule di dimensioni notevoli, occupanti interamente il lume. Anche lo stroma ghiandolare risulta ben sviluppato ed è costituito da cellule muscolari lisce (Feldman, 2002).

La produzione ormonale da parte del testicolo è regolata da due gonadotropine, la follicolostimolante (FSH) e la luteinizzante (LH), prodotte a livello di ipofisi anteriore per azione di un ormone stimolante la produzione di gonadotropine (*Gonadotropin*

Realising Hormone, GnRH), secreto dall'ipotalamo. L'LH stimola la produzione del testosterone a livello testicolare da parte delle cellule interstiziali del Leydig (Dobson, 1995). Come tutti gli steroidi, la produzione di testosterone deriva dal colesterolo. Il legame dell'LH a specifici recettori siti sulle cellule del Leydig, stimola la produzione di AMP ciclico che attiva, di conseguenza, una protein-chinasi A provocante la mobilitazione dei precursori degli steroidi, in particolare tramite la conversione del colesterolo in pregnenolone. Il pregnenolone viene poi convertito in testosterone che penetra nel tubulo seminifero e viene liberato nel torrente circolatorio (Feldman, 2002; Sjaastad *et al.* 2004). Il meccanismo che regola la produzione di testosterone e, a monte, di LH è detto a feedback negativo: l'aumento del testosterone ematico provoca infatti una diminuzione della sintesi dell'LH e delle GnRH con conseguente decremento della produzione del testosterone stesso (Feldman, 2002).

A livello di tubulo seminifero il testosterone partecipa al trofismo ed alle funzioni secretorie e assorbenti dei tubuli efferenti, dell'epididimo, dei dotti deferenti e della prostata; per via sistemica favorisce invece la normale libido (Feldman *et al.*, 1998). A livello di circolo sistemico solo il 2% del testosterone totale si presenta in forma libera, il restante si ritrova legato a proteine quali albumine e globuline (Markham *et al.*, 1994; Sjaastad *et al.* 2004). Solo il testosterone libero diffonde nel tessuto prostatico (Markham *et al.*, 1994).

La crescita di volume della prostata e l'attività secernente che la caratterizza, dipendono dal deidrotestosterone (DHT), metabolita del testosterone (T), ottenuto a livello della ghiandola per azione dell'enzima 5 α -reduttasi (Johnston, 2000; Markham *et al.*, 1994). La 5 α -reduttasi sembra essere localizzata nella membrana nucleare delle cellule prostatiche epiteliali (Ganong, 1987). La conversione del testosterone in DHT avviene anche a livello di fegato e vescichette seminali, nelle specie che le presentano. Il DHT dal punto di vista biologico è maggiormente attivo del testosterone, poiché si lega ai recettori per gli androgeni con un'affinità doppia rispetto a quest'ultimo e con una velocità di dissociazione inferiore di 5 volte (Kutzler, 2008).

Gli androgeni, in particolare l'androstendione, sono prodotti in quantità minima anche a livello di surrenali, per influenza dell'ormone corticotropo (ACTH) prodotto a livello di ipofisi; il loro effetto però sulla prostata è irrilevante (Markham *et al.*, 1994).

Le cellule del Sertoli sono stimulate dal testosterone, prodotto dalle cellule di Leydig, e dall'FSH a secernere sostanze atte a promuovere la proliferazione degli spermatogoni e il differenziamento in spermatozoi (Hill *et al.*, 2004). Fra tali sostanze, le proteine leganti gli androgeni (*androgen-binding protein*, ABP) rivestono un importante ruolo poiché, legando per l'appunto il testosterone, ne permettono l'accumulo in elevate concentrazioni a livello dei tubuli seminiferi e dell'interstizio del testicolo. Le cellule del Sertoli inoltre secernono l'*inibina* che stimola la steroidogenesi a livello delle cellule del Leydig e, come il testosterone, esercita una retroazione negativa a livello di ipofisi anteriore, con conseguente diminuzione della produzione di FSH (Hill *et al.*, 2004; Cunningham J. G. *et al.*, 2007).

Gli estrogeni sono prodotti sia dalle cellule del Leydig sia dalle cellule del Sertoli, a partire da precursori steroidei sintetizzati dalle cellule del Leydig (Dobson, 1995). Una parte del testosterone testicolare viene convertito in estradiolo, per azione dell'enzima aromatasi, a livello sia del tratto genitale che del cervello. L'attività dell'aromatasi è significativa nelle cellule del Sertoli, che secernono quindi elevate quantità di estrogeni. Recettori per gli estrogeni sono stati identificati a livello di cervello, prostata, ossa e tessuto adiposo (Sherwood *et al.*, 2005). A livello prostatico gli estrogeni antagonizzano l'effetto degli androgeni non agendo in maniera diretta sul parenchima prostatico, ma con un'azione di feedback negativo sulla produzione di LH da parte dell'ipofisi, con conseguente diminuita produzione di testosterone da parte del testicolo. (Markham *et al.*, 1994).

Dosaggi ormonali

Il dosaggio ormonale del testosterone sistemico varia entro valori di 1-5 ng/mL, mentre il tasso di testosterone a livello gonadico si attesta intorno a valori di 50-100 volte superiori a quelli riportati per il testosterone periferico (Feldman *et al.*, 1998). Nell'uomo si riscontrano valori di testosterone di 40-50 µg/100 mL rilevati nella vena spermatica, mentre a livello periferico il tasso di testosterone si attesta intorno a valori circa 75 volte inferiori: 600 ng/100 mL (Markham *et al.*, 1994). Cani sessualmente maturi e caratterizzati da una libido normale, non presentano valori di testosterone periferico inferiori a 0,4 ng/mL; mentre valori inferiori a 0,002 ng/mL caratterizzano i cani castrati. Cani criptorchidi presentano valori di testosterone periferico compresi in

un range fra 0,1 e 2 ng/mL (Feldman *et al.*, 1998). Nell'uomo il dosaggio normale di testosterone è di 611 ng/ 100 mL \pm 186 (range 300-1.000) e presenta fisiologicamente un graduale declino a partire dai 70 anni d'età verso valori di 500 ng/100 mL (Markham *et al.*, 1994). Le concentrazioni plasmatiche di DHT nell'uomo sono circa 11 volte inferiori rispetto ai valori riportati per il testosterone, in particolare si attestano intorno ai 56 ± 20 ng/ 100 mL. Nella prostata però la situazione si inverte e la quantità di DHT presente supera di circa 5 volte quella di testosterone (Markham *et al.*, 1994).

1.3 Cenni di fisiopatologia della prostata

Le patologie prostatiche più comuni nel cane, come nell'uomo, sono l'iperplasia prostatica benigna, le prostatiti, le cisti prostatiche, gli ascessi e le neoplasie.

Le patologie prostatiche interessano l'80% dei cani d'età maggiore ai 10 anni, e lo 0.6% dei cani di 4 anni d'età. L'età media alla diagnosi di patologia prostatica si aggira intorno ai 9 anni (Krawiec, 1992). Non vi è una particolare predisposizione di razza alla patologia prostatica, anche se i pastori tedeschi ed i Dobermann risultano le razze maggiormente interessate (Smith, 2008).

Fra le patologie prostatiche quella ad incidenza maggiore è sicuramente l'iperplasia prostatica benigna (Barsanti *et al.*, 1995), seguita dalle cisti prostatiche, dalle prostatiti, dalle neoplasie e dagli ascessi (Smith, 2008).

L'iperplasia prostatica benigna (IPB) è un'evoluzione spontanea dell'organo correlata all'avanzare dell'età del cane, rappresentata da una fisiologica iperplasia ghiandolare che interessa la totalità dei cani a partire da circa i 3 anni d'età (Smith, 2008). L'IPB verrà ampiamente trattata nel successivo paragrafo 1.3.1.

Le cisti prostatiche vengono in genere suddivise in 4 grandi categorie: le piccole e multiple cisti associate ad IPB, le cisti da ritenzione, le cisti paraprostatiche e le cisti associate a metaplasia squamosa (Dorfman *et al.*, 1998). A parte le prime (incidenza del 14%) (Black *et al.*, 1998), l'incidenza delle cisti è bassa e si aggira intorno ad un 2,6-5,3% (Dorfman *et al.*, 1998). Le cisti tendono ad interessare prevalentemente cani di taglia medio-grande e nel 42% dei casi il loro contenuto è settico (Black *et al.*, 1998). Le cisti associate ad IPB derivano da un accumulo di secreto prostatico all'interno del parenchima dell'organo, secondario all'ostruzione dei canalicoli prostatici (Smith, 2008). Le cisti paraprostatiche invece, sembrerebbero derivare da residui dei dotti di Muller (Dorfman *et al.*, 1998).

Le prostatiti sono causate da una colonizzazione batterica della ghiandola che origina o per via ascendente dall'uretra, o dal circolo ematico sistemico. I batteri che si isolano prevalentemente sono gli *Escherichia Coli*, seguiti dai *Mycoplasma*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp. e *Brucella canis* (Smith, 2008).

Gli ascessi, rappresentati da ampie sacche di materiale purulento presenti a carico del parenchima prostatico, sono molto rari e risultano una sequela delle prostatiti croniche (Smith, 2008).

Le neoplasie prostatiche rappresentano il 5-7% di tutte le patologie prostatiche (Memon, 2007) e l'età media alla diagnosi si aggira intorno ai 10 anni, con un range variabile dai 5 ai 17 anni (Cornell *et al.*, 1997). Opinione comune è che la neoplasia prostatica colpisca soprattutto i cani orchiectomizzati (Smith, 2008; LeRoy *et al.*, 2009), in particolare il rischio di svilupparla è 2.38 volte maggiore per un cane castrato rispetto ad un cane intero (Bell *et al.*, 1991). L'adenocarcinoma è la neoplasia diagnosticata con frequenza maggiore, in percentuale variabile dallo 0.6% (Weaver, 1981) al 16% (Hornbuckle *et al.*, 1989) a seconda degli autori. Altre neoplasie che possono interessare la ghiandola sono: il tumore a cellule di transizione (Smith, 2008), il linfosarcoma, l'emangiosarcoma ed il tumore a cellule squamose (Johnston *et al.*, 2001).

1.3.1 L'iperplasia prostatica benigna (IPB)

Con il termine di iperplasia prostatica benigna (IPB) ci si riferisce ad un aumento uniforme delle dimensioni della prostata dovuto ad una marcata proliferazione cellulare, normale con l'accrescersi dell'età del cane. La ghiandola viene coinvolta in maniera diffusa e presenta un'espansione verso l'esterno, principalmente in direzione dorsale. (Gobello, 2002). Le dimensioni medie di una prostata interessata da IPB, valutate su un gruppo di 36 cani, sono di 4.5 (diametro laterolaterale) x 3.2 (diametro dorsoventrale) x 4.5 (lunghezza), ed il peso medio raggiunto dalla ghiandola si aggira intorno ai 35 gr (Atalan *et al.*, 1999).

Lo sviluppo prostatico può essere suddiviso in 3 grandi periodi: dalla vita fetale fino al secondo anno vita dell'animale, seguito da una seconda fase di sviluppo esponenziale androgeno-dipendente che termina verso l'undicesimo anno di vita del cane, infine si ha una fase senile di involuzione prostatica (O'Shea, 1962). Il 16% dei cani presenta infatti già a 2 anni d'età, un'ipertrofia (aumento del volume cellulare) ed iperplasia (aumento numerico) delle cellule prostatiche (Johnston *et al.*, 2001).

L'IPB risulta quindi la patologia prostatica che si riscontra più frequentemente: in uno studio condotto su 88 cani interessati da patologia prostatica, 51 di essi presentavano IPB (Read, 1995).

L'IPB interessa il 60% dei cani che ha superato i 5 anni d'età (Barsanti, 1993), mentre colpisce l'80% (Cotard, 1988) / 100% (Barsanti, 1993) dei cani d'età superiore ai 10 anni. L'incidenza dell'IPB infatti, incrementa proporzionalmente all'aumentare dell'età: in uno studio condotto su cani Beagle il 40% di essi presentava IPB a 2.5 anni, superati i 6 anni di età l'80% di essi era interessato dall'IPB, infine la percentuale di cani colpiti dall'IPB raggiungeva il 95% nei soggetti d'età maggiore ai 9 anni (Lowseth *et al.*, 1993).

L'età media alla diagnosi di IPB varia fra i 7.7 (Read, 1995) e gli 8.4 anni (Krawiec, 1992). Nei cani di età superiore ai 4 anni l'IPB è associata in genere allo sviluppo di plurime formazioni cistiche di piccole dimensioni a carico del parenchima prostatico, dovute alla ritenzione di liquidi in seguito all'ostruzione dei canalicoli prostatici (Gobello, 2002).

L'eziopatogenesi dell'IPB non è tuttora ben definita ma sicuramente è data da uno squilibrio nel rapporto androgeni/ estrogeni prodotti dal testicolo (Smith, 2008). Con l'avanzare d'età del cane decrescono i livelli di testosterone e DHT circolanti, mentre la produzione di estrogeni rimane invariata. A livello prostatico gli estrogeni inducono un aumento dei recettori del DHT, accrescendo la sensibilità dell'organo nei confronti di tale ormone. L'accumulo di DHT a livello prostatico sarebbe causato da modificazioni cataboliche e da un'aumentata attività di legame dell'ormone con i recettori per gli androgeni. Tale accumulo di DHT comporta una crescita sia della componente stromale che ghiandolare dell'organo (Gobello, 2002).

Dal punto di vista istologico, l'IPB viene distinta in "semplice" e "complessa".

L'IPB "*semplice*" si caratterizza per la presenza di un epitelio secernente aumentato di volume ed alveoli molto sviluppati specie a carico della zona periuretrale, mentre lo stroma non risulta abbondante.

In corso di IPB "*complessa*" affianco a zone d'iperplasia ghiandolare si rinvengono aree con alveoli atrofici o marcatamente dilatati, specie a livello della zona periuretrale (Brendler *et al.*, 1983). Gli alveoli dilatati possono dare origine a cisti, di dimensioni variabili da pochi millimetri a diversi centimetri (Romagnoli *et al.*, 2006).

L'IPB può essere asintomatica o sintomatica. Se asintomatica, viene vista come una normale evoluzione dello stato clinico della prostata correlato all'avanzare dell'età del cane; se associata a sintomatologia si ricade invece in quadro di patologia prostatica.

La sintomatologia riferibile ad IPB comprende segni clinici urinari, quali ematuria e perdite ematiche uretrali, od enterici, quali tenesmo rettale, dischezia e feci nastriformi. Le perdite ematiche uretrali non correlate alla minzione dipendono da un'aumentata vascolarizzazione della prostata in corso di IPB, e si sono rivelate l'unico sintomo clinico nel 71.5% dei cani affetti da tale patologia (Read, 1995). Il sanguinamento è in genere aggravato dalla vicinanza di cagne in calore, fattore che determina eccitazione e conseguente contrazione delle cellule mioepiteliali stratificate sugli acini prostatici (Romagnoli *et al.*, 2006).

I sintomi enterici derivano da un'ostruzione parziale del retto data dalla compressione esercitata su di esso da parte della prostata ingrossata (Barsanti, 1993). Raramente l'aumento di volume dell'organo è tale da provocare un'ostruzione uretrale con conseguente disuria ed incontinenza (Barsanti, 1993; Dorfman, 1998).

I cani colpiti da IPB si mostrano comunque vigili ed attivi e non presentano alcuna sintomatologia sistemica (Barsanti, 1993).

CAPITOLO 2 ASPETTI BIOCHIMICI DELLA PROSTATA

2.1 Il plasma seminale

L'eiaculato è di norma composto da spermatozoi e da una componente liquida denominata plasma seminale, che fornisce un ambiente adeguato al mantenimento della vitalità e della motilità degli spermatozoi nel tratto genitale femminile (Dellman *et al.*, 1994). La composizione del plasma seminale differisce fra le varie specie animali tranne che per il fruttosio, fattore sempre presente e principale fonte di energia per gli spermatozoi. La produzione di fruttosio è a carico delle vescichette seminali; per questo motivo nelle specie in cui tali ghiandole sessuali accessorie sono assenti, come il cane, il fruttosio presenta concentrazione nettamente minore (Reece, 2009). La concentrazione del fruttosio nel plasma seminale dipende inoltre da diversi fattori quali la frequenza di eiaculazione, la concentrazione di glucosio ematico, lo stato nutrizionale. Nel plasma seminale di uomo la sua concentrazione si attesta intorno a valori di circa 200 mg/ 100 mL (Markham *et al.*, 1994).

Altri elementi presenti nel plasma seminale sono: elettroliti, acido ascorbico, vitamine, prostaglandine (Reece, 2009), amminoacidi, proteine, acidi grassi e diversi enzimi a seconda della specie animale (Derivaux, 1974).

Fra gli elettroliti si ricordano il sodio, il calcio, il magnesio ed il potassio. Il potassio ed il magnesio favoriscono il movimento degli spermatozoi, il calcio ed altri ioni agiscono in senso inverso (Derivaux, 1974). Ne deriva che la motilità degli spermatozoi dipende dal rapporto fra le concentrazioni di calcio e magnesio nel plasma seminale. Basse concentrazioni di calcio ed elevate concentrazioni di magnesio, nell'eiaculato dei volatili spiegano la caratteristica ipercinesia degli spermatozoi di tali animali (Pèrez, 1994).

Le prostaglandine invece facilitano la fertilizzazione dell'ovocita incrementando la recettività del muco cervicale allo sperma e provocando contrazioni della muscolatura liscia, facilitanti il trasporto dello sperma verso l'ovaio, attraverso l'utero e l'ovidutto (Reece, 2009).

Alcune delle piccole molecole presenti nel plasma seminale sono: la creatinina e la creatina, l'arginina, la spermina, la glicina e l'acido glutammico; quest'ultimo in particolare costituisce la base aminica fondamentale del plasma seminale in tutte le specie animali (Pèrez, 1994).

I lipidi del plasma seminale sono di origine prostatica e si trattano di fosfolipidi contenenti colina e suoi derivati. Nei ruminanti, ad esempio, la colesterina è stata correlata alla capacità fecondante degli spermatozoi, ed è risultata in concentrazioni maggiori nelle specie ad eiaculazione vaginale (Pèrez, 1994).

Fra gli enzimi rinvenibili nel plasma seminale, quelli di probabile natura prostatica sono: la fosfatasi acida e alcalina, gli enzimi proteolitici, le glicosidasi e l'aspartato amino transferasi (Feldman, 2002). Nell'uomo un incremento della fosfatasi acida nel plasma seminale è imputabile ad un inizio ed allo sviluppo di neoplasia prostatica. Nel cane sano la fosfatasi acida oscilla fra 0 e 7 U/l, mentre in corso di IPB o prostatite tali valori subiscono un incremento del 25%, in particolare in soggetti interessati da cisti prostatiche il dosaggio della fosfatasi acida supera sempre i 7 U/l (Jaworek *et al.*, 2001). Nella prostata di cane, la fosfatasi acida si localizza a livello di cellule epiteliali secretorie; comunque la sua concentrazione nel tessuto e nel secreto prostatico di tale specie è nettamente più bassa di quella rilevata nell'uomo (Dubé *et al.*, 1985). Nello stallone invece, i massimi dosaggi di fosfatasi acida si rinvencono nella frazione dell'eiaculato maggiormente ricca di spermatozoi, facendo presumere che in questa specie la fosfatasi acida abbia un'origine testicolare e/o epididimale. Inoltre la quantità di fosfatasi acida rinvenuta nell'eiaculato di stallone, presenta una correlazione positiva con la conta degli spermatozoi (Kareskoski *et al.*, 2010).

Nel cane la fosfatasi alcalina (come la carnitina) è considerata un marker della presenza del secreto epididimale nell'eiaculato, e potrebbe essere prodotta in minima quantità anche a livello testicolare (Frenette *et al.*, 1986; Gobello *et al.*, 2002).

Il plasma seminale contiene inoltre acido citrico, ergotioneina, inositolo, fosforilcolina e la glicerofosforilcolina. Sotto l'effetto del testosterone testicolare tali sostanze sono secrete dalla ghiandole accessorie del tratto genitale maschile; scompaiono infatti a seguito della castrazione e ricompaiono dopo iniezioni di testosterone (Derivaux, 1974). L'acido citrico origina in genere dalle vescichette seminali, ma non nell'uomo in cui ha origine prostatica (Setchell *et al.*, 1994). Tale acido promuove la coagulazione dello

sperma. L'ergotioneina invece, preserva il mantenimento della motilità degli spermatozoi e si rinviene soprattutto nel plasma seminale di orso, stallone, zebra ed asino (Derivaux, 1974; Setchell *et al.*, 1994). La glicerofosforilcolina è di origine epididimale e si rinviene in abbondanza nel plasma seminale di stallone, montone, toro, becco e verro, mentre la fosforilcolina si rinviene soprattutto nello sperma umano (Derivaux, 1974).

2.2 Il secreto prostatico

Il secreto prostatico è un liquido con un pH che oscilla fra 6 e 7.4, atto a neutralizzare le secrezioni acide della vagina, favorendo la vitalità degli spermatozoi in un ambiente leggermente basico (Sherwood *et al.*, 2005). Il 97% del volume totale dell'eiaculato è rappresentato dal secreto prostatico (Kutzler, 2008); si comprende così il perché fisiologicamente il volume di sperma emesso aumenti in maniera lineare al peso ed alle dimensioni prostatiche (Feldman, 2002). È stato però valutato che in caso di patologia prostatica, come in corso di IPB cistica, si verifica una sensibile riduzione del volume spermatico, rispetto a soggetti con prostate normali di pari volume (Feldman, 2002). Nel cane il secreto prostatico si rinviene nella prima e soprattutto nella terza frazione dell'eiaculato (Gobello, 2002). La prima frazione dell'eiaculato origina dall'uretra e dalla prostata, è chiara ed in genere non supera in volume i 2 ml. La terza frazione è solo di origine prostatica e può superare i 15 ml di volume ed essere emessa in un tempo variabile fra i 5 ed i 25 minuti (Smith, 2008).

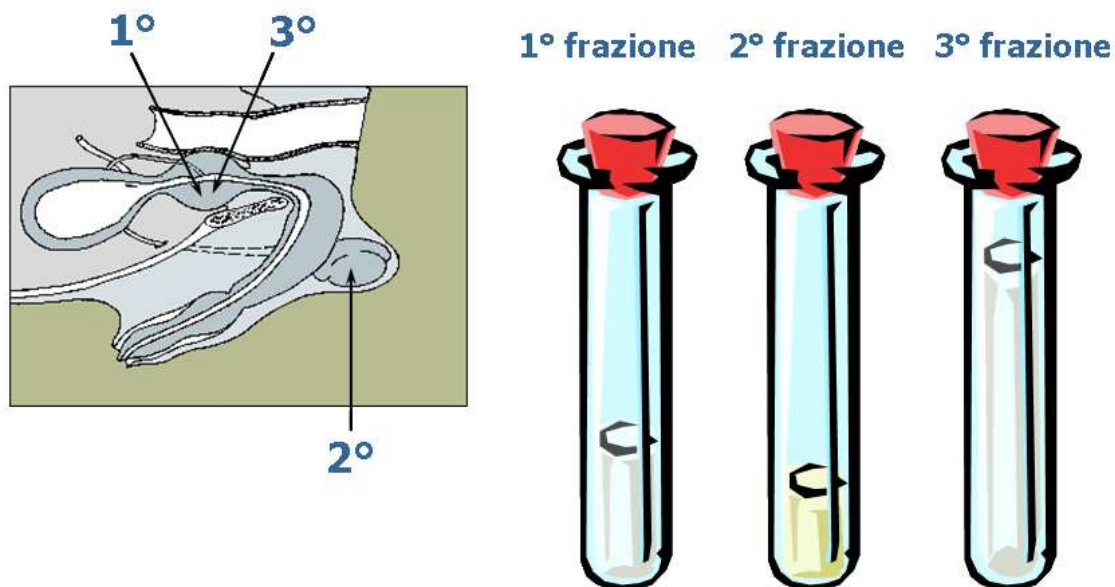


Figura 2.1: Schema rappresentativo dell'origine delle tre frazioni dell'eiaculato di cane. Notare come la seconda frazioni di origine testicolare sia quella di volume minore ma maggiormente concentrata (è la frazione contenente gli spermatozoi).

Il liquido prostatico di cane presenta una predominanza degli ioni sodio e cloro, mentre quello dell'uomo contiene soprattutto calcio, potassio e citrato (Setchell *et al.*, 1994).

Nell'uomo le tre proteine di origine prostatica per eccellenza sono: l'antigene specifico per la prostata (PSA), la fosfatasi acida prostatica (PAP) e la proteina prostatica specifica (PSP94) (Abrahamsson *et al.*, 1990). Nel cane, è l'arginina esterasi il maggior prodotto secretorio della prostata, e rappresenta il 90% delle proteine del plasma seminale (Kutzler, 2008).

Un metallo che è stato identificato essere in tutte le specie un marker prostatico, ed indice quindi della normale funzionalità della ghiandola, è lo zinco (Zn) (Sanada *et al.*, 1985).

Vista l'importanza, nello studio biochimico dello stato clinico e dell'attività della prostata, dello Zn e dell'arginina esterasi, quest'ultimi sono oggetto di approfondimento nei paragrafi seguenti.

2.2.1 Profilo proteico del plasma seminale

Il plasma seminale è stato analizzato dal punto di vista elettroforetico nel cane, nel toro, nello stallone e nell'ariete.

Nel bovino, il profilo proteico è stato associato a particolari caratteristiche del plasma seminale quali la fertilità (Killian *et al.*, 1993) e la facilità di congelamento (Jobim *et al.*, 2004). Sono state infatti identificate mediante elettroforesi 2D-page, delle specifiche proteine correlate alla maggior fertilità di alcuni tori Holstein rispetto ad altri (Killian *et al.*, 1993), e alla minor o maggiore predisposizione al congelamento del materiale seminale (Jobim *et al.*, 2004).

Nel gatto e nell'ariete sono state osservate delle differenze nel profilo proteico, correlabili alla metodica di prelievo del materiale seminale. Nell'ariete il profilo elettroforetico degli eiaculati prelevati mediante elettroeiaculazione, presentava due bande proteiche in più (15 kDa, 22 kDa) e l'assenza della banda di peso molecolare di 25 kDa, rispetto agli eiaculati prelevati con vagina artificiale (Jiménez, 2008). Nel gatto invece, il profilo proteico del materiale seminale prelevato mediante cateterismo uretrale, una volta raggiunto l'effetto farmacologico della medetomidina, era caratterizzato da un maggior numero di bande proteiche, in particolare di peso molecolare pari a 55 kDa e 14 kDa, e dalla maggior concentrazione di 4 bande (66 kDa, 22 kDa, 12 kDa e 5.5 kDa) (Zambelli *et al.*, 2010).

Nel cane, lo studio del profilo proteico del plasma seminale ha permesso di identificare delle particolari bande proteiche quali marker delle secrezioni prostatiche ed epididimali. La banda B20 di peso molecolare pari a 15.6 kDa, presente in concentrazione elevata in tutti i cani esaminati, è stata identificata essere una subunità dell'arginina esterasi, considerata marker della normale funzionalità prostatica (De Souza *et al.*, 2007). Le bande proteiche B9 (42.6 kDa) e B13 (29.2 kDa) invece, si sono rivelate dei marker delle secrezioni epididimali, poiché assenti nei campioni di eiaculato raccolti dopo aver sottoposto i cani a vasectomia (De Souza *et al.*, 2006). Inoltre, nel cane come nel toro, sono state determinate correlazioni positive fra alcuni parametri relativi al materiale seminale, quali la vitalità e la motilità spermatica, e la presenza di determinate bande proteiche quali quelle a 67 kDa e a 58.6 kDa (Killian *et al.*, 1993; De

Souza *et al.*, 2006). Nel gatto al contrario, non sono state identificate correlazioni fra il profilo elettroforetico del plasma seminale ed i parametri relativi alla valutazione dello sperma; poiché il profilo proteico dei gatti con eiaculato privo di spermatozoi risultava simile a quello degli altri (Zambelli *et al.*, 2010).

Nel cane il numero di bande proteiche identificate dopo frazionamento elettroforetico supera la trentina, e la maggior parte di esse si concentrano a livello di pesi molecolari inferiori a 17 kDa (De Souza *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2007). Nel gatto le bande proteiche si concentrano prettamente in due particolari zone del profilo elettroforetico: una, come nel cane, a livello di pesi molecolari inferiori ai 22 kDa, l'altra invece ad elevato peso molecolare, in particolare fra i 200 kDa ed i 60 kDa (Zambelli *et al.*, 2010). Il toro e l'ariete, al contrario, presentano poche bande proteiche concentrate in una zona del profilo elettroforetico fra gli 11-14 kDa ed i 24-26 kDa (Jobim *et al.*, 2004; Jiménez, 2008). Il profilo proteico del plasma seminale di stallone presenta un numero di bande proteiche compatibili a quelle osservabili nel toro, ma distribuite all'interno di un range di pesi molecolari variabile da 14 kDa a 120 kDa (Frazer, 1996).

2.2.2 L'arginina esterasi

L'arginina esterasi, come precedentemente ricordato, rappresenta il 90% delle proteine del plasma seminale di cane (Chapdelaine *et al.*, 1984; Dubé *et al.*, 1985; Kutzler, 2008) ed è di origine prostatica (Frenette *et al.*, 1987). In particolare si ritrova nella cellule ghiandolari dell'organo (Gobello *et al.*, 2002). La sintesi dell'arginina esterasi è sotto il controllo ormonale, infatti tale proteina è androgeno-dipendente: la castrazione ne comporta la scomparsa dal plasma seminale, mentre l'iniezione di 3- α androstenediolo la fa ricomparire (Dubé *et al.*, 1985).

All'elettroforesi su gel di poliacrilammide l'arginina esterasi presenta un peso molecolare di 25 kDa ed in condizioni denaturanti, in presenza di mercaptoetanolo e SDS, subisce la rottura dei ponti disolfuro che legano le due catene proteiche che la compongono, dando origine a due bande proteiche rispettivamente di 15 kDa e 14 kDa di peso molecolare (Chapdelaine *et al.*, 1984).

Nell'uomo la funzione dell'arginina esterasi, enzima ad attività simil-proteolitica, è di idrolizzare il coagulo formato dal materiale seminale, poco dopo la sua emissione. Nel cane l'eiaculato non forma alcun coagulo, quindi l'attività dell'arginina esterasi risulta poco chiara; si ipotizza comunque che possa liquefare il muco del tratto genitale femminile (Dubé *et al.*, 1985).

L'arginina esterasi è stata anche associata alla classe delle callicreine in quanto la sua sequenza aminoacidica presenta un'omologia del 64% con la callicreina pancreatica del suino, ed il suo peso molecolare è simile a quello della callicreina delle ghiandole salivari; ma a differenza di quest'ultime non è in grado di idrolizzare il chininogeno del plasma seminale di cane (Frenette *et al.*; 1985).

Si ritiene inoltre che l'arginina esterasi possa esplicare la sua attività a carico della coda degli spermatozoi, poiché è stata identificata in tale sito tramite immunofluorescenza (Frenette *et al.*; 1985).

L'arginina esterasi è stata comparata con la maggior proteina secreta dalla prostata di uomo: l'antigene specifico per la prostata (PSA). Entrambe le proteine infatti presentano pesi molecolari simili, 29 kDa per l'arginina esterasi e 34 kDa per la PSA, sono enzimi appartenenti alla classe delle serin-proteasi, e hanno un'omologia del 58% a livello della

porzione terminale NH₂ della sequenza aminoacidica (Dubé *et al.*, 1986). La PSA nell'uomo aumenta notevolmente in corso di neoplasia prostatica, mentre nel cane interessato da tale patologia, l'arginina esterasi non subisce incremento alcuno. In corso di IPB però, i valori di arginina esterasi nel cane sono risultati notevolmente aumentati (Gobello *et al.*, 2002).

Ulteriori studi sono necessari per indagare l'attività dell'arginina esterasi ed il ruolo di tale enzima in corso di patologia prostatica.

2.2.3 Lo zinco (Zn)

Minerale di grande importanza nella composizione del plasma seminale è lo zinco (Zn) (Pèrez, 1994), poiché stabilizza la membrana cellulare e la cromatina nucleare degli spermatozoi (Lin *et al.*, 2000).

Lo Zn è un metallo traccia che presenta un ruolo essenziale per oltre 200 enzimi fra cui la carbossipeptidasi, la fosfatasi alcalina, l'alcool deidrogenasi, l'anidrasi carbonica e la superossido dismutasi; risulta quindi coinvolto nel metabolismo di carboidrati, lipidi, proteine ed acidi nucleici (Rucker *et al.*, 2008). A livello enzimatico lo Zn svolge essenzialmente 3 funzioni: *catalitica*, poiché partecipa attivamente alle reazioni enzimatiche, *coattiva*, poiché il legame fra atomi di Zn modula la funzione catalitica, e *strutturale*, poiché gli atomi di zinco sono essenziali per stabilizzare la struttura quaternaria di alcuni enzimi (Vallee *et al.*, 1993).

Lo Zn inoltre partecipa alla formarmazione di domini (*Zn-binding fingers*) tramite i quali le proteine interagiscono con il DNA, l'RNA od i ribosomi, assicurando quindi la stabilità delle strutture nucleiche (Tapiero *et al.*, 2003; Rucker *et al.*, 2008).

Allo Zn sono state anche attribuite proprietà antiossidanti; sembra infatti che esso contrasti l'azione di particolari composti reattivi dell'ossigeno (ROS) che provocano l'ossidazione di lipidi, proteine, DNA, provocando seri danni cellulari (Colagar *et al.*, 2009).

Lo Zn infine, ricopre un ruolo importante nello sviluppo dei testicoli e nelle funzioni fisiologiche dello sperma; infatti un deficit di Zn provoca ipogonadismo, diminuzione del volume testicolare, inadeguato sviluppo dei caratteri sessuali secondari e atrofia dei tubuli seminiferi (Colagar *et al.*, 2009). Indice dell'importante ruolo dello Zn nella spermatogenesi e steroidogenesi, è il ritrovamento di basse concentrazioni di Zn seminale ed ematico, associate a basse concentrazioni di testosterone ematico, in uomini infertili oligospermici od azospermici (Ali *et al.*; 2005). In tori carenti di Zn inoltre, si è verificata la perdita della capacità di produzione di androgeni, con successiva scomparsa della funzione spermatogenetica (Pèrez, 1994).

Gli alti livelli di Zn nel plasma seminale di uomo, pari a 140 µg/ mL, derivano principalmente dalle secrezioni prostatiche (488 ± 18 µg/ mL); tale ghiandola presenta

infatti la maggior concentrazione di Zn (50 mg/ 100 g in peso secco) rispetto a qualsiasi altro organo (Markham *et al.*, 1994). Nell'uomo infatti, la concentrazione di Zn nella prostata supera di 3-7 volte quella degli altri organi (Shu-Fei *et al.*, 2009). La medesima situazione di verifica nel cane, dove la quantità di Zn nell'eiaculato supera di 7 volte la quantità di Zn nel sangue (Bartlett, 1962). Nell'uomo affetto da iperplasia prostatica benigna, i valori di Zn nel plasma seminale risultano stabili od elevati, mentre in caso di adenocarcinoma prostatico il contenuto di Zn decresce notevolmente. Nella prostata di uomo lo Zn si localizza principalmente nelle cellule secretorie, mentre nel ratto, le maggiori quantità di zinco risultano nello stroma, in particolare a livello della membrana basale (Markham *et al.*, 1994). Nella prostata di gatto lo Zn si concentra a livello dell'area apicale delle cellule secretorie e nel lume ghiandolare, indicando l'origine prostatica di tale metallo nel plasma seminale (Aughey, 1970). A differenza di tutte le altre specie, nell'orso l'origine dello Zn nel plasma seminale è stata attribuita alle vescichette seminali (Boursnell *et al.*, 1972).

Definita l'origine prostatica dello Zn, ne consegue che la sua concentrazione totale nel plasma seminale risulta indicativa di una normale funzionalità della ghiandola prostatica stessa (Sanada *et al.*, 1985).

La correlazione tra la concentrazione dello Zn, la quantità totale di esso nell'eiaculato, e la fertilità del soggetto esaminato, è stata oggetto di diversi studi con risultati discordanti.

Alcuni di essi riportano non esserci differenze nella concentrazione di Zn e nella quantità totale di esso, valutate nello sperma o nel sangue, di uomini sani o affetti da problemi di fertilità di diverso tipo o grado (Sanada *et al.*, 1985; Wong *et al.*, 2001). Altri, al contrario, hanno successivamente evidenziato concentrazioni significativamente maggiori di Zn nel plasma seminale di uomini fertili, rispetto agli infertili (Colagar *et al.*, 2009).

I primi studi riguardo eventuali correlazioni fra la concentrazione di Zn nel plasma seminale e le caratteristiche dell'eiaculato, hanno empiricamente riportato che: uomini recanti spermatozoi meno motili, presentavano le minori concentrazioni di Zn nel plasma seminale (Sanada *et al.*, 1985). Altri autori, al contrario, sostengono di non aver rilevato alcuna relazione tra la concentrazione di Zn, la quantità totale di quest'ultimo

nell'eiaculato e le caratteristiche dello sperma quali ad esempio, la concentrazione e la motilità percentuale e progressiva (Lin *et al.*, 2000).

In seguito, è stato riportata una correlazione positiva fra la concentrazione dell'eiaculato e la concentrazione seminale dello Zn (Wong *et al.*, 2001; Colagar *et al.*, 2009), fra quest'ultima e la normale morfologia del seme (Colagar *et al.*, 2009), fra la motilità, la morfologia, la concentrazione del seme e la concentrazione ematica dello Zn (Wong *et al.*, 2001).

Dalla valutazione della concentrazione seminale di Zn in soggetti fumatori e non fumatori, è emerso che suddetta concentrazione risulta maggiore, seppur in maniera non significativa, nei non fumatori, che risulterebbero così meno predisposti all'infertilità (Colagar *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

In soggetti astenozoospermici, la somministrazione orale di Zn ha fornito una maggior protezione degli spermatozoi dai danni causati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), comportando un miglioramento nella qualità dello sperma, specie nella motilità e nell'integrità della membrana spermatica (Omu *et al.*, 2008). Altri studi hanno dimostrato che una dieta appropriata, associata ad un'integrazione di Zn assunta per bocca, permette di ridurre il rischio di sviluppo del tumore alla prostata nell'uomo (Gonzales *et al.*, 2009); infatti si è visto che i pazienti affetti da neoplasia prostatica presentano livello ematici di Zn assai inferiori ai pazienti sani o interessati da IPB (Adaramoye *et al.*, 2010).

Elevate concentrazioni di Zn sono state rilevate nel materiale seminale di orso (171.74 ± 65.72 mg/kg), rispetto allo stallone (86.20 ± 45.88 mg/kg), al toro (83.15 ± 61.61 mg/kg), al topo (60.46 ± 35.37 mg/kg) ed alla volpe (13.09 ± 5.22 mg/kg) (Massányi *et al.*, 2003).

CAPITOLO 3 ASPETTI CLINICI DELLA PROSTATA DI CANE

Quando si sospetta una patologia prostatica è necessaria la raccolta di un'approfondita anamnesi e l'esecuzione di un attento esame obiettivo generale e particolare, relativo all'apparato riproduttore. Durante l'esame clinico relativo all'apparato genitale maschile, la prostata può essere indagata mediante palpazione digito-rettale. Informazioni utili da raccogliere sono: la durata e l'evoluzione dei sintomi, le abitudini di minzione e defecazione del cane, eventuali manifestazioni di disturbo sistemico (Dorfman *et al.*, 1998).

Esami collaterali che ci indirizzano verso una diagnosi sono: la radiografia, l'ecografia, l'esame dell'eiaculato, la biopsia.

Per quanto concerne l'esame dell'eiaculato, nei precedenti paragrafi sono già stati approfonditi gli aspetti biochimici del plasma seminale. Nei paragrafi successivi descriviamo gli aspetti radiografici, biotici ed in particolare ecografici della prostata. Particolare attenzione verterà sull'esame ecografico in bianco e nero e con mezzo di contrasto, in quanto oggetto del nostro studio.

3.1 La palpazione

Lo stato della prostata può essere apprezzato con la palpazione digito-rettale della porzione caudo-dorsale dell'organo, sebbene la posizione di quest'ultimo dipenda dallo stato di replezione della vescica, dall'età del cane e dallo stato clinico della ghiandola stessa (Gobello, 2002; Dyce *et al.*, 2009). Per rendere più agevole la manualità, l'esplorazione rettale può essere associata alla palpazione addominale dell'organo, atta a spingere caudalmente la prostata verso il dito situ nel retto. Alla palpazione si valutano le dimensioni, la simmetria, la forma, la consistenza e la dolorabilità della prostata che, se sana, risulta liscia, simmetrica e indolente (Dorfman, 1998; Smith, 2008; Dyce *et al.*, 2009). Una prostata ipertrofica mantiene gli stessi parametri alla palpazione, ma appare aumentata di volume da 2 a 6.5 volte rispetto ad una ghiandola in condizioni normali (Gobello, 2002).

3.2 La radiografia

La radiografia non è sicuramente la tecnica di elezione per studiare la prostata poiché non sempre tale organo risulta radiograficamente identificabile, specie se il retto appare marcatamente disteso per la presenza di abbondante contenuto fecale (Lattimer *et al.*, 2007; Costello, 2009). Con l'esame radiografico è possibile studiare le dimensioni, la forma, i contorni e la posizione dell'organo (Smith, 2008). La proiezione migliore per visualizzare tale ghiandola è la laterale del settore addominale caudale: a vescica piena la prostata si osserva subito cranialmente al pavimento pubico, a vescica vuota si situa invece del tutto o in parte in cavità pelvica (Dorfman, 1998). Per una visualizzazione ottimale dell'organo è opportuno centrare la radiografia della porzione caudale dell'addome all'incirca 1-2 cm cranialmente rispetto all'articolazione dell'anca (Costello, 2009). In proiezione ventrodorsale la prostata è situa a metà del pavimento pelvico, o leggermente spostata verso destra o sinistra.

La visibilità dell'organo dipende dal contrasto con il tessuto adiposo che la circonda (Kealy *et al.*, 2005, Costello, 2009); in cani molto magri o che presentano una raccolta liquida in prossimità del collo della vescica, l'organo è difficilmente evidenziabile (Lattimer *et al.*, 2007). Dal punto di vista radiografico, la ghiandola sana appare come una struttura ovoidale, a radiopacità omogenea tipica dei tessuti molli, a contorno liscio (Kealy *et al.*, 2005, Costello, 2009). Una prostata di normali dimensioni valutata alla radiografia ventrodorsale non deve superare la metà della larghezza dell'entrata della pelvi, mentre alla radiografia laterale non deve superare il 70% della distanza fra il promontorio del sacro ed il pube (Nylan, 1995).

La sensibilità della radiografia nell'identificazione della patologia prostatica si limita all'eventuale osservazione di foci di mineralizzazione, associabili a neoplasia prostatica nel 100% dei cani castrati e nel 22% dei cani interi (Bradbury *et al.*, 2009). Infatti l'IPB, la prostatite, gli ascessi possono essere di difficile, se non impossibile, differenziazione alle radiografie convenzionali (Stowater *et al.*, 1989).

In corso di IPB, si possono radiograficamente evidenziare uno spostamento craniale della vescica urinaria, ed uno spostamento dorsale del colon, più o meno associato alla sua compressione, provocati dalla prostatomegalia. Un segno radiografico di

prostatomegalia è inoltre la presenza di un triangolo di tessuto adiposo tra la vescica, la prostata e la parete addominale ventrale (Lattimer *et al.*, 2007).

Tecniche d'aiuto nella visualizzazione radiografica della prostata sono: l'uretrocistografia con mezzo di contrasto positivo, che permette di differenziare la vescica dalla prostata nel caso siano presenti ad esempio grosse cisti paraprostatiche, e l'uretrocistografia retrograda, che permette la valutazione dell'uretra prostatica. Il diametro normale dell'uretra prostatica deve essere da 1 a 2.7 volte quello dell'uretra pelvica media. Una riduzione del diametro dell'uretra prostatica può essere associata a cisti paraprostatiche, ascessi o neoplasia prostatica (Dorfman, 1998). Un piccolo difetto di riempimento, localizzato nella parete dorsale dell'uretra prostatica, in prossimità del centro della ghiandola, rappresenta il collicolo seminale (Lattimer *et al.*, 2007).

3.3 L'ecografia

L'esame ecografico della prostata si esegue con il cane in decubito laterale o dorsale in approccio prepubico, utilizzando una sonda settoriale da 7.5-10 MHz (Nylan, 1995). L'ecografia transrettale potrebbe permettere una migliore visualizzazione dell'organo ma richiede la sedazione del soggetto (Costello, 2009). Posizionando la sonda a destra o sinistra del pene, si effettuano scansioni trasversali e longitudinali sovrapubiche dell'organo, al fine di visualizzare tutte le aree della ghiandola (Busoni, 2007).

Fino ai 2 mesi d'età la prostata è posizionata in cavità addominale, a causa dell'attaccamento uracale che mantiene la vescica urinaria in posizione cranio ventrale (Nylan *et al.*, 1995). In seguito, come conseguenza del degradamento del residuo uracale, la prostata si sposta in cavità pelvica. Con il raggiungimento della maturità sessuale, gli ormoni sessuali maschili stimolano un accrescimento del volume prostatico che provoca un progressivo spostamento dell'organo in cavità addominale (Nylan 1995; Dorfman, 1998). Il marcato aumento di volume della prostata, evidenziato fra i 4 ed i 16 mesi di vita del soggetto, va di pari passo ad un raddoppiamento del peso dell'organo stesso, che avviene nel giro di 7-8 mesi (Ambrosio *et al.*, 1998). In seguito alla castrazione, la marcata atrofia della prostata fa sì che l'organo torni in posizione intrapelvica (Nylan *et al.*, 1995).

Il volume prostatico è correlato all'età e alla taglia del cane, e la normale dimensione dell'organo non è ancora stata stabilita con precisione. L'esperienza permette comunque di acquisire un'immagine mentale soggettiva della propria soglia di criterio della normale apparenza della prostata, per forma e dimensione (Nylan, 1995). Lo Scottish Terrier presenta fisiologicamente una prostata di dimensioni 4 volte maggiori rispetto a cani di taglia ed età simile (Costello, 2009).

Il volume prostatico espresso in cm^3 nel cane può essere determinato tramite la seguente formula: $([L \times W \times D] / 2.6) + 1.8$, dove con la lettera L ci si riferisce alla lunghezza della prostata, con la W al diametro latero-laterale e con la D al diametro dorsoventrale misurati ecograficamente. Il diametro W e D devono essere misurati in una sezione trasversale visualizzata a metà dell'uretra prostatica, mentre la L in una sezione longitudinale comprendente l'uretra (Kamolpatana *et al.*, 2000).

Per identificare ecograficamente la prostata, si sceglie come punto di repere il collo della vescica e lo si segue caudalmente, inclinando la sonda in modo tale da orientare caudalmente il campo di visione (Busoni, 2007). La visione dell'organo è facilitata dalla presenza di urina in vescica che spinge cranialmente l'organo (Kealy *et al.*, 2005; Costello, 2009). La prostata può essere in contatto col trigono vescicale o separata da esso da una piccola porzione di uretra pelvica. Dorsalmente alla prostata, il colon distale appare in genere come una sottile linea iperecogena, o una struttura curvilinea con un'ombra acustica secondaria dovuta alla presenza di gas (Nylan, 1995).

Ecograficamente la prostata normale presenta un parenchima ad ecogenicità omogenea con una tessitura media-fine. L'ecogenicità varia da iperecogena a ipoecogena a seconda del soggetto, anche se in genere è normale rinvenire una media ecogenicità dell'organo. In sezione trasversale è identificabile la forma bilobata della prostata e, sul piano mediano dell'organo, si può valutare l'uretra prostatica che appare come una struttura anecogena o ipoecogena, rotondeggiante, in posizione centrale o leggermente dorsale (Busoni, 2007; Nylan, 1995).

In sezione longitudinale la prostata è di forma da ovale a rotonda, e l'uretra si presenta come una struttura lineare ipoecogena che l'attraversa in tutta la sua lunghezza, dividendola in una porzione superiore ed inferiore.

Il lume uretrale può normalmente presentarsi circondato da tessuto fibroso periuretrale ecogeno, a sua volta circondato da una zona ipoecogena (Busoni, 2007; Hecht, 2008).

La capsula prostatica ecograficamente appare come un sottile bordo iperecogeno (Busoni, 2007; Mattoon, 2002).

Nei cani castrati la prostata appare piccola, omogenea ed ipoecogena (Hecht, 2008).



Figura 3.1: Sezione longitudinale-7,5 MHz. Cane meticcio di 2 anni. Prostata sana. Notare l'uretra che si presenta come una struttura lineare ipoecogena che attraversa la ghiandola per tutta la sua lunghezza, dividendola in due porzioni: superiore ed inferiore. Il parenchima appare omogeneo ad ecogenicità intermedia.

Lo studio ecografico della prostata è stato correlato all'aspetto istologico dell'organo. In sezione trasversa, nel parenchima prostatico è evidenziabile un'area centrale, determinata dalle fibre collagene circondanti i dotti prostatici, che si prolunga lateralmente verso i due lobi prostatici, assumendo un aspetto approssimativamente a farfalla, caratterizzata da una maggiore ecogenicità rispetto il parenchima circostante. Dorsalmente e ventralmente a tale area, il tessuto ghiandolare appare come una zona pressappoco triangolare ed ipoecogena. Un sottile bordo ipoecogeno di tessuto ghiandolare è identificabile anche al di sotto della capsula prostatica lungo la circonferenza dell'organo.

In sezione longitudinale, il collagene forma un'area ovale centrale circondata da una zona ipoecogena di tessuto ghiandolare. In un cane prepubere il parenchima prostatico appare diffusamente iperecogeno per il marcato sviluppo del tessuto connettivale e la mancanza di tessuto ghiandolare (Mattoon, 2002).

3.3.1 Cenni di ecografia in corso di iperplasia prostatica benigna

All'esame ecografico, una prostata ipertrofica presenta un aumento armonico delle dimensioni ed una distribuzione uniforme di echi interni ad ecogenicità media od

aumentata, omogenea o disomogenea, tale da conferire un aspetto finemente granulare o nodulare del parenchima (Mattoon *et al.*, 2002). La texture del parenchima varia quindi da fine a grossolana, e si possono osservare dei foci iperecogeni disseminati, ritenuti secondari all'incremento della vascolarizzazione e fibrosi (Mattoon *et al.*, 2002). La forma bilobata ed il contorno ben definito si mantengono, in genere, anche in corso di IPB. Spesso sono osservabili aree rotondeggianti, anecogene, di pochi millimetri di diametro correlabili alla presenza di microcisti (Fedrigo, 2001; Busoni, 2007). In caso di cisti le cavità anecogene risultano ben definite e a margini lisci (Gobello, 2002).



Figura 3.2: Sezione trasversale-7,5 MHz. Cane meticcio di 6 anni. Prostata con iperplasia prostatica benigna. Notare l'aumento di dimensioni dell'organo. Il parenchima si presenta disomogeneo per la presenza di aree nodulari isoecogene. La forma dell'organo si mantiene bilobata ed i margini appaiono ben definiti.

3.4 La biopsia

La biopsia prostatica può essere eseguita per via percutanea perirettale o transaddominale, oppure per via laparotomia. La prima tecnica è rapida e richiede soltanto una sedazione dell'animale, anche se impedisce la visualizzazione dell'area di prelievo, comportando il rischio di tralasciare i tessuti patologici, o di pungere inavvertitamente vasi sanguigni, l'uretra, cavità cistiche o ascessuali. È consigliabile quindi eseguire tale tecnica sotto controllo ecoguidato.

La biopsia per via laparotomica si esegue in corso di interventi chirurgici a carico dell'organo (Dorfman *et al.*, 1998).



Figura 3.3: Esecuzione di una biopsia prostatica percutanea trans addominale ecoguidata con ago da 14 G. Nella foto a destra, particolare della carota di tessuto prelevato.

CAPITOLO 4 PARTE SPERIMENTALE

Introduzione

Il lavoro eseguito comprende 3 differenti studi inerenti l'approfondimento di diversi aspetti della fisiopatologia della prostata, in particolare l'aspetto clinico, biochimico ed ormonale.

Per quanto riguarda l'aspetto clinico è stato eseguito uno studio ecografico sull'accrescimento e sviluppo della ghiandola, a partire dai 4 giorni di vita all'anno di età del cane.

L'aspetto biochimico dell'organo è stato indagato nel secondo studio, analizzando l'eventuali differenze nel profilo proteico e nel profilo dello zinco, valutato con spettrofotometria ad assorbimento atomico, su campioni di plasma seminale di cani sani o cani affetti da iperplasia prostatica benigna sintomatica od asintomatica. Lo studio è stato eseguito allo scopo di valutare se l'approccio biochimico ai problemi prostatici possa essere d'aiuto nella diagnosi della più comune patologia della prostata, l'iperplasia prostatica benigna.

Il terzo studio inerente l'aspetto ormonale della prostata, completa lo studio precedente, analizzando le eventuali differenze ormonali (Testosterone, Estrogeni e Progesterone) riscontrabili fra due gruppi di cani: i cani sani e quelli affetti da iperplasia prostatica benigna.

4.1 Studio 1: Aspetti Clinici

4.1.1 Materiale e metodi

Presso i ricoveri della Sezione di Riproduzione Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna, è stata ospitata per circa 2 mesi, una cagna gravida appartenente al canile del Trebbo di Reno di Bologna. La cagna è stata ivi alloggiata poiché potesse portare a termine la gravidanza e partorire in un luogo più sereno, confortevole e in cui potesse ricevere adeguate cure veterinarie.

Il travaglio è incominciato alle 22 della sera. La cagna ha dato alla luce 5 cuccioli in 4 ore con parto naturale, successivamente, causa inerzia secondaria da esaurimento delle energie, è stato necessario un taglio cesareo per far nascere gli ultimi 4 cuccioli. Dei 9 cuccioli nati, 3 erano femmine e 6 erano maschi. La permanenza della cagna e dei cuccioli presso i ricoveri della Sezione di Riproduzione Animale si è prolungata fino allo svezzamento completo dei cuccioli (circa due mesi), momento in cui sono stati affidati ai futuri proprietari.



Figura 4.1: Foto della cagna ospitata presso i ricoveri del Servizio di Riproduzione Animale e dei suoi cuccioli

Ognuno dei 6 cuccioli maschi è stato sottoposto ad esame ecografico della prostata effettuato a 4, 12, 23, 45 giorni di vita. Successivamente i cuccioli sono stati dati in adozione. Dei nuovi proprietari soltanto 3 su 6 hanno acconsentito ad eseguire il monitoraggio ecografico dell'accrescimento della prostata a 4.5 mesi, 7 mesi, 8 mesi, 11 mesi e 13 mesi d'età.

Fino a 4,5 mesi di età le ecografie sono state eseguite con un ecografo altamente performante, utilizzando la sonda lineare da 12 MHz, mentre dai 7 mesi d'età in su è stato utilizzando un ecografo Esaote Pandion 300 S con sonda microconvex da 10 MHz. L'esame ecografico è stato eseguito mantenendo il cucciolo in decubito dorsale con approccio trans-addominale.

Una volta visualizzata la prostata, nella sezione trasversale sono stati misurati i due diametri dorso-ventrale (D) e latero-laterale (W). In sezione longitudinale invece, è stata misurata la lunghezza (L) dell'organo. Nelle due sezioni, trasversale e longitudinale, ogni diametro è stato rilevato tre volte e il valore finale risulta dalla media dei tre valori calcolati. Il volume della prostata è stato calcolato secondo la formula:

$$VP = [(D \times W \times L) / 2,6] + 1,8 \text{ (Kalmopatana et al., 2000).}$$

4.1.2 Risultati

Le immagini ecografiche seguenti mostrano le sezioni trasversali e longitudinali di alcune delle prostate esaminate a 4, 12, 23, 45 gg di vita e a 4.5, 7, 8, 11, 13 mesi d'età. La descrizioni delle immagini riportate esprimono i risultati ottenuti:

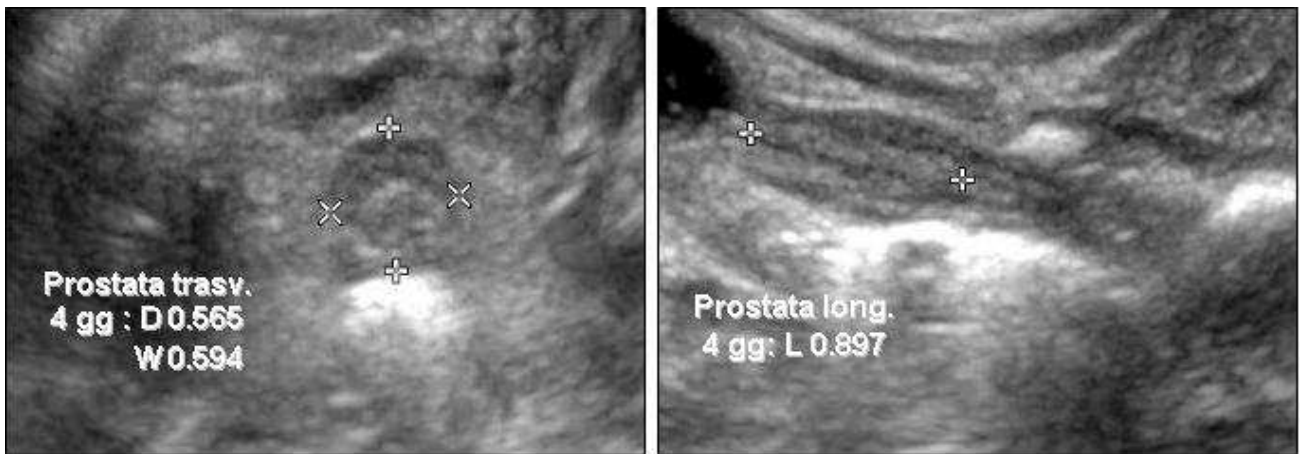


Figura 4.2: Sezione trasversale (a sinistra) e longitudinale (a destra) della prostata di un cucciolo a 4 gg di vita. L'organo si presenta a margini netti e l'ecogenicità del parenchima risulta omogenea, come nel cane adulto. Notare come la forma dell'organo sia rotondeggiante, mancante della tipica lobatura presente nella prostata di cane adulto. Il parenchima prostatico inoltre appare marcatamente ipoecogeno se comparato all'ecogenicità della ghiandola di cane adulto.

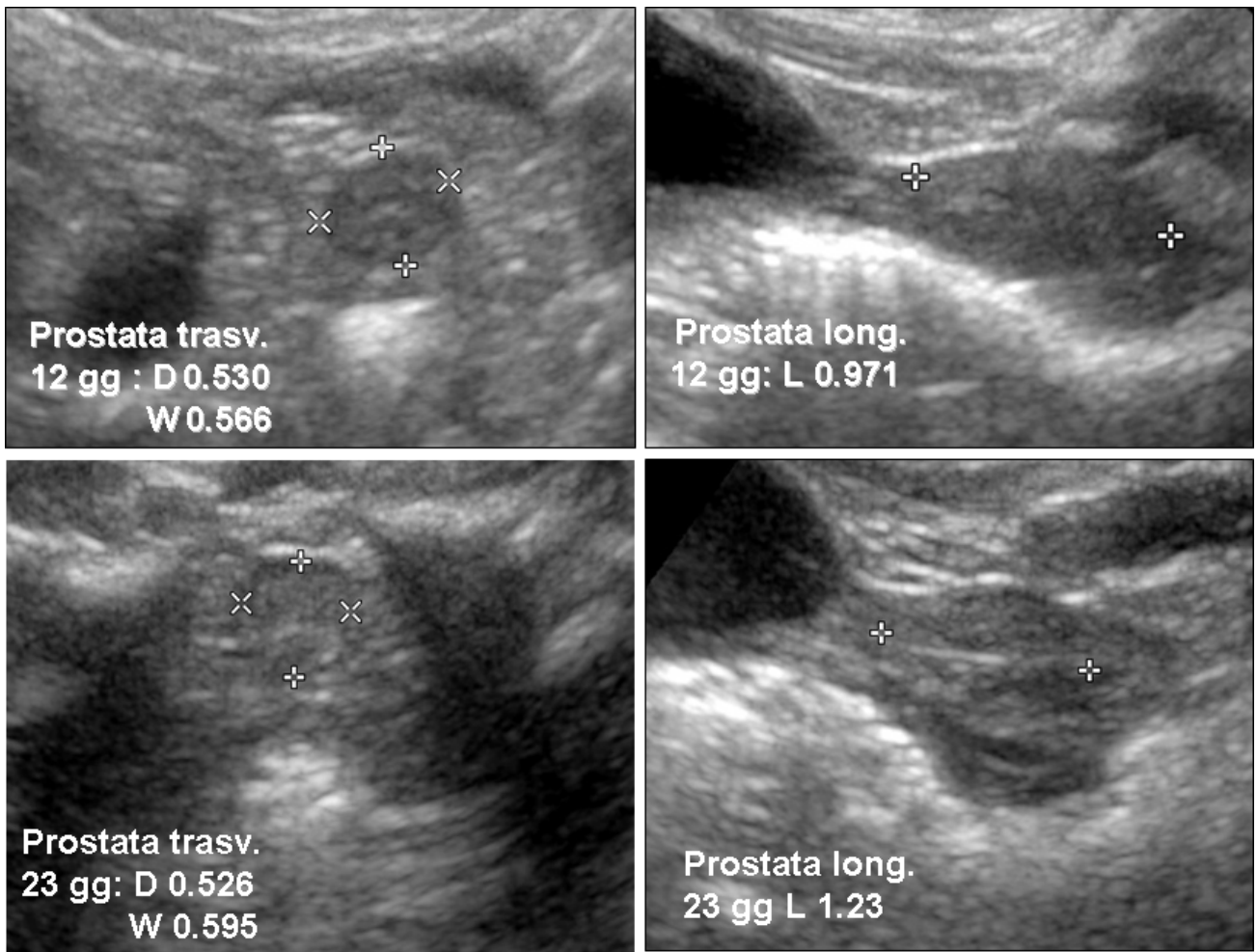


Figura 4.3: Le prime due foto mostrano la sezione trasversale (a sinistra) e longitudinale (a destra) della prostata di un cucciolo a 12 gg di vita; le seconde foto mostrano la sezione trasversale e longitudinale dell'organo in un cucciolo di 23 gg di vita. L'aspetto dell'organo è molto simile a quello osservabile nel cucciolo a 4 gg di vita, e precedentemente descritto. Si nota un lieve aumento delle dimensioni dell'organo.

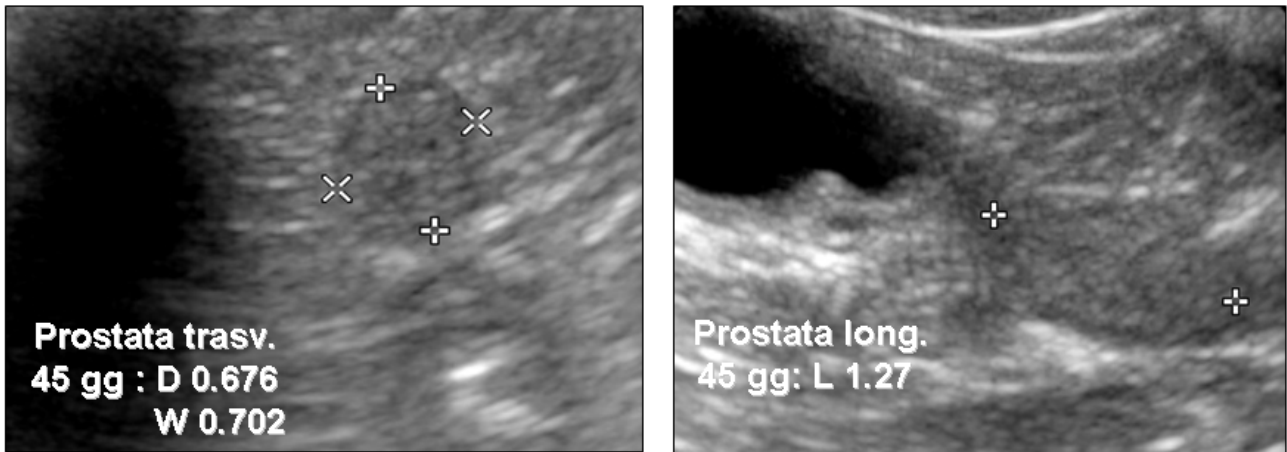


Figura 4.4: Immagini ecografiche relative alla prostata di un cucciolo di 45 gg di vita. Rispetto alle immagini precedenti si nota un aumento delle dimensioni dell'organo, specie della lunghezza ed un aumento dell'ecogenicità del parenchima prostatico.

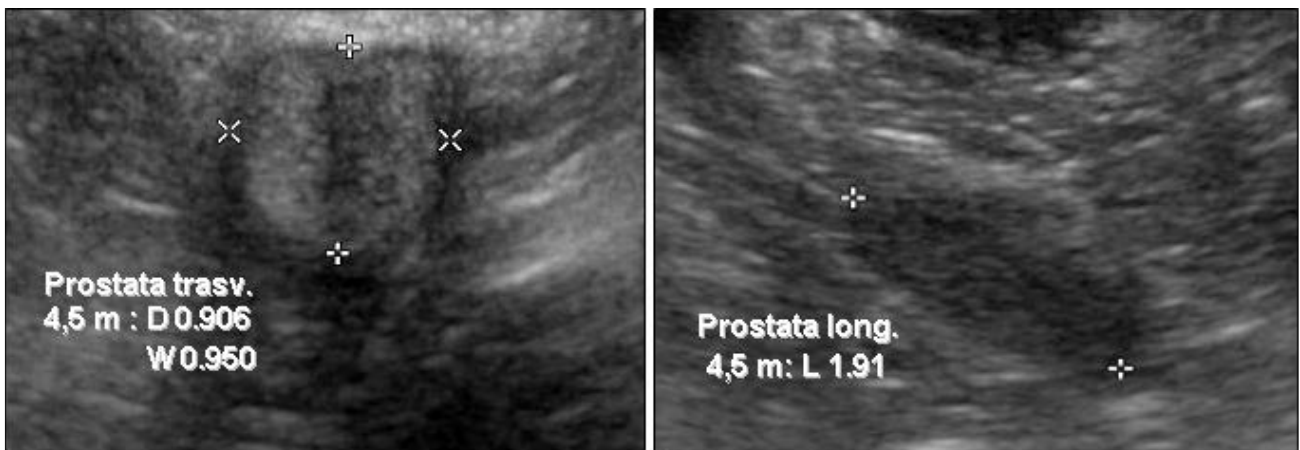


Figura 4.5: Sezione trasversale (a sinistra) e longitudinale (a destra) della prostata di un cucciolo a 4.5 mesi d'età. L'organo si mantiene a margini netti ed è osservabile la lobatura tipica che caratterizza la prostata di un cane adulto. Il parenchima prostatico appare sempre omogeneo ma si nota un marcato aumento dell'ecogenicità di quest'ultimo.

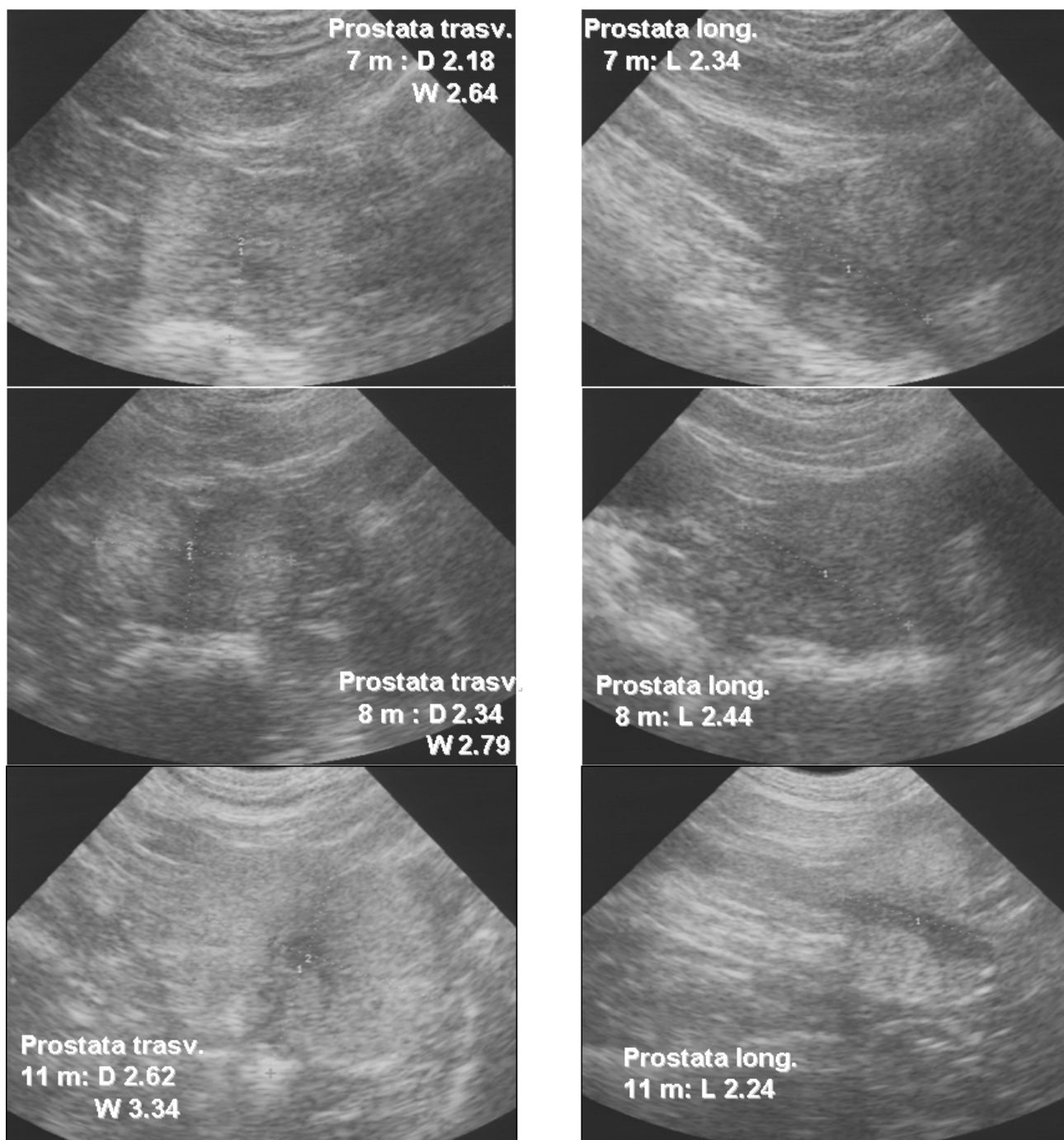
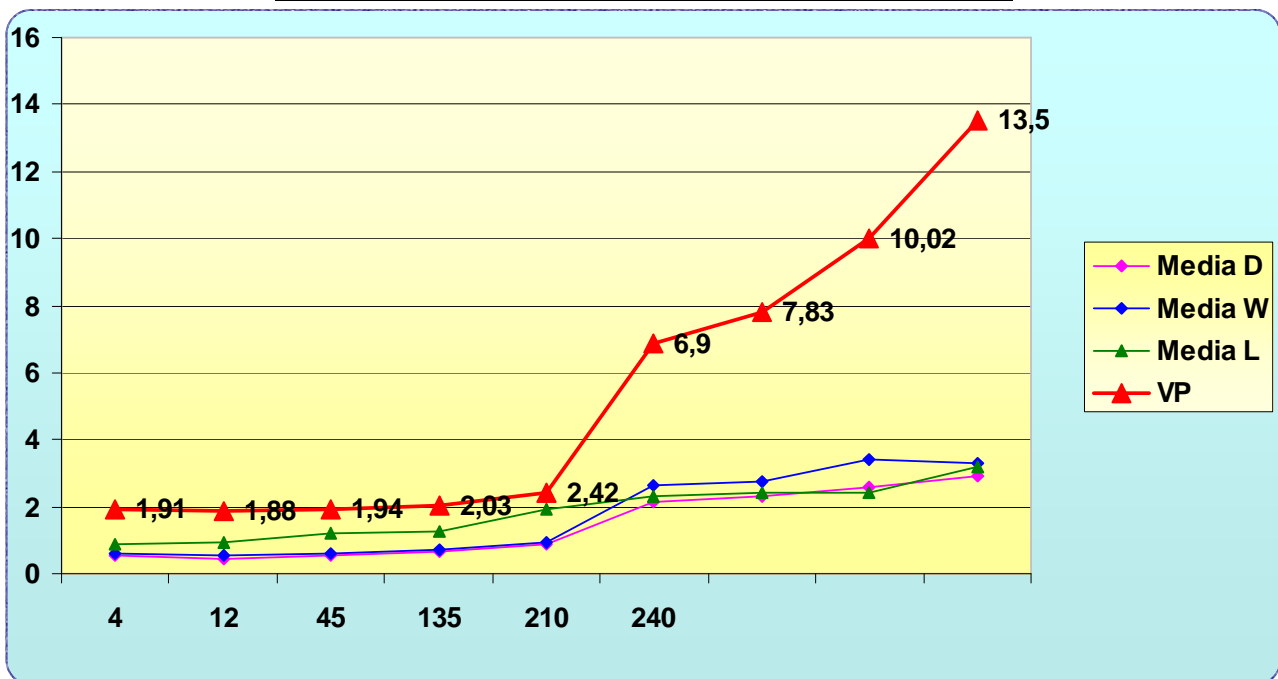


Figura 4.6: Le prime due foto mostrano la sezione trasversale (a sinistra) e longitudinale (a destra) della prostata di un cane di 7 mesi d'età, le seconde foto di un cane di 8 mesi d'età, e le ultime due foto di un cane di 11 mesi d'età. L'aspetto ecografico dell'organo è comparabile a quello di un cane adulto: la prostata presenta margini ben definiti, la lobatura si fa più accentuata dividendo l'organo in due lobi simmetrici. Il parenchima prostatico si presenta omogeneo con una texture media/ fine ed ecogenicità

intermedia Ben evidente l'area triangolare ed ipoecogena data dal tessuto ghiandolare periuretrale, in posizione dorsale.

Tabella 4.7: Nella tabella in alto si riportano i valori medi dei diametri *D, W, L* e del volume prostatico (*VP*) rilevate nei cani a 4, 12, 23, 45 gg d'età e a 4,5, 7, 8, 11, 13 mesi di vita. Nella figura in basso è schematizzato l'andamento dell'accrescimento della prostata. La linea rossa rappresenta la variazione del volume prostatico, calcolato a partire dalla misura media del *D, W* e *L* secondo la formula indicata da Kalmopatana *et al.*, 2000.

Età	Media D	Media W	Media L	Media VP
4 gg	0,564	0,593	0,896	1,91
12 gg	0,42	0,54	0,93	1,88
23 gg	0,525	0,595	1,23	1,94
45 gg	0,676	0,702	1,27	2,03
4,5 mesi	0,904	0,943	1,91	2,42
7 mesi	2,17	2,64	2,33	6,9
8 mesi	2,33	2,77	2,43	7,83
11 mesi	2,6	3,4	2,42	10,02
13 mesi	2,9	3,3	3,2	13,5



4.1.3 Discussione

Lo sviluppo della prostata nel cane viene arbitrariamente suddiviso in tre fasi: la fase compresa fra l'anno di vita ed i 5 anni di età in cui si ha un accrescimento lineare dell'organo, la fase fra i 6 ed i 10 anni d'età in cui la prostata subisce un accrescimento esponenziale, legato alla crescita iperplastica di quest'ultima, ed una terza ed ultima fase d'involutione senile, superati gli 11 anni d'età (O'Shea, 1962). Oramai è pertanto appurato che, a partire dall'anno d'età del cane, l'accrescimento della prostata risulti positivamente correlato all'età ed al peso del cane stesso (Ambrosio *et al.*, 1998; Atalan *et al.*, 1999). In letteratura però non vi sono studi riguardanti lo sviluppo prostatico in fase prepubere. Solo un autore riporta che non vi è relazione alcuna fra il peso della prostata e l'età del cane, in animali al di sotto dell'anno di vita (Diquélou *et al.*, 1997). Nel nostro studio invece è stato possibile verificare una correlazione lineare fra il progredire dell'età del cane e l'accrescersi della prostata e del suo volume (Tabella 4.7). Valutando il volume prostatico medio, si è osservato come dai 4.5 mesi di vita ai 13 mesi di vita vi sia un aumento delle dimensioni della prostata di circa le 5 volte, mentre tra gli 8 mesi ed i 13 mesi di età si verifica un raddoppiamento delle dimensioni dell'organo. I nostri risultati confermano il raddoppiamento di peso della prostata, evidenziato tra i 4 ed i 16 mesi di vita del cane, registrato da Ambrosio *et al.* (Ambrosio *et al.*, 1998).

Le ecografie eseguite al 4, 12, 23 e 45 gg di vita ci hanno permesso di identificare una prostata sita totalmente in cavità addominale; l'organo infatti sino ai 2 mesi d'età presenta tale posizione per l'attaccamento uracale alla vescica urinaria (Nylan, 1995). In seguito alla degradazione del residuo uracale stesso, la prostata assume posizione pelvica (Nylan T. G., 1995; Dorfman M., 1998), identificabile nel nostro studio a partire dai 4.5 mesi d'età. Col raggiungimento della pubertà, l'incremento della produzione di androgeni stimola lo sviluppo della prostata, che aumenta di dimensioni e si riporta verso la cavità addominale. Nello studio da noi eseguito i cani esaminati a 11 e 13 mesi presentavano una prostata sita soltanto parzialmente in cavità addominale (Nylan T. G., 1995; Dorfman M., 1998).

Nei quadri ecografici visualizzati fino al 45 giorno di vita è interessante notare come non sia presente una marcata differenziazione fra lo stroma ed il tessuto ghiandolare del parenchima prostatico, rinvenibile invece a 4 mesi e mezzo. Tale riscontro rispecchia il quadro ormonale: infatti alla nascita la produzione del testosterone, l'ormone che promuove lo sviluppo del tessuto ghiandolare, si riduce notevolmente, per poi progressivamente aumentare con l'avvicinarsi del raggiungimento della pubertà (Sherwood L. *et al.*, 2005).

In conclusione, il nostro lavoro completa gli studi ecografici relativi allo sviluppo della prostata, poiché la letteratura è mancante di dati inerenti l'accrescimento di tale organo, in cani d'età inferiore all'anno di vita. Possiamo affermare quindi che la correlazione lineare fra volume della prostata ed età del cane si riscontra fin dalla nascita; pertanto nella suddivisione suggerita da O'Shea (O'Shea, 1962), nella prima fase d'accrescimento lineare della prostata, può essere compreso anche il primo anno di vita del cane (Prima fase: dalla nascita ai 5 anni di vita).

4.2 Studio 2: Aspetti Biochimici

4.2.1 Materiali e metodi

Animali

Lo studio è stato eseguito analizzando campioni di plasma seminale ottenuti da 83 cani interi appartenenti a 27 razze diverse, d'età compresa fra i 7 mesi ed i 14 anni, e di peso variabile da un minimo di 3 a un massimo di 82 kg. Tutti i cani esaminati erano interi ed esenti da patologie testicolari; in particolare tutti i testicoli dei soggetti esaminati presentavano sede scrotale, ed alla palpazione ed ecografia non sono state rinvenute anomalie a carico di quest'ultimi. I cani presentavano un legittimo proprietario o provenivano da un canile.

In particolare i 57 campioni di plasma seminale raccolti presso il servizio di riproduzione della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna, provenivano da cani afferiti all'istituto per una visita andrologica specialistica per un sospetto di patologia prostatica.

I 17 campioni raccolti presso l'École Nationale Veterinaire d'Alfort, Paris, provenivano da cani stalloni di razza e di elevata genealogia, afferiti alla facoltà per accoppiamento con fecondazione artificiale o congelamento del materiale seminale.

Infine i 9 campioni raccolti presso la Facultad de Ciencias Veterinarias de l'Universitiad Nacional de la Plata, Buenos Aires, provenivano da cani Pastori Tedeschi, Schnauzer o Pastori Belga del canile della Polizia di Stato.

I campioni di plasma seminale raccolti in Francia ed in Argentina sono stati trasportati in Italia refrigerati, allo scopo di evitare la degradazione dei campioni stessi.

Raccolta dati anamnestici

La raccolta dell'anamnesi di tutti i cani è stata eseguita formulando al proprietario (o conducente del cane, nel caso di animali provenienti dal canile) delle precise domande raccolte in un modulo cartaceo prestampato, in modo tale da creare una cartella clinica standard per ogni soggetto esaminato. L'anamnesi dei cani provenienti da canile è risultata deficitaria in molte sue parti.

Di seguito si riporta un esempio del modulo utilizzato:

Programma Prevenzione Prostata

Data _____

Proprietario _____ N. telefonico _____

ID animale _____ Razza _____ Età _____ Peso _____

Alimentazione

Casalinga: _____

Commerciale Marca : _____

Mista: _____ Marca : _____

Accoppiamenti: SI NO , Naturale Artificiale Gravidanza: SI NO

SINTOMATOLOGIA:

Ha mai sofferto di patologie urogenitali e/o gastroenteriche? _____

_____ Terapie effettuate? Quali? _____

Risultati: Risoluzione Miglioramento Stabile Peggioramento

Ha mai presentato:

Presenta:

<input type="checkbox"/> Perdite ematiche uretrali <input type="checkbox"/> lieve <input type="checkbox"/> moderata <input type="checkbox"/> grave	<input type="checkbox"/> Rare gocce <input type="checkbox"/> Molte gocce <input type="checkbox"/> Macchie	Numero _____ Durata _____	Terapia _____ <input type="checkbox"/> risoluzione <input type="checkbox"/> miglioramento <input type="checkbox"/> stabile <input type="checkbox"/> peggioramento	<input type="checkbox"/> Rare gocce <input type="checkbox"/> Molte gocce <input type="checkbox"/> Macchie	Da quanto: _____
<input type="checkbox"/> Ematuria <input type="checkbox"/> lieve <input type="checkbox"/> moderata <input type="checkbox"/> grave	<input type="checkbox"/> Iniziale <input type="checkbox"/> Finale <input type="checkbox"/> Totale	Numero _____ Durata _____	Terapia _____ <input type="checkbox"/> risoluzione <input type="checkbox"/> miglioramento <input type="checkbox"/> stabile <input type="checkbox"/> peggioramento	<input type="checkbox"/> Iniziale <input type="checkbox"/> Finale <input type="checkbox"/> Totale	Da quanto: _____
<input type="checkbox"/> Dischezia <input type="checkbox"/> lieve <input type="checkbox"/> moderata <input type="checkbox"/> grave		Numero _____ Durata _____	Terapia _____ <input type="checkbox"/> risoluzione <input type="checkbox"/> miglioramento <input type="checkbox"/> stabile <input type="checkbox"/> peggioramento		Da quanto: _____

<input type="checkbox"/> Disuria <input type="checkbox"/> lieve <input type="checkbox"/> moderata <input type="checkbox"/> grave		Numero _____	Terapia _____		Da quanto: _____
		Durata _____	<input type="checkbox"/> risoluzione <input type="checkbox"/> miglioramento <input type="checkbox"/> stabile <input type="checkbox"/> peggioramento		

Ha presentato:

Presenta:

<input type="checkbox"/> tenesmo rettale <input type="checkbox"/> diarrea <input type="checkbox"/> stipsi <input type="checkbox"/> dimagrimento <input type="checkbox"/> disoressia/ anoressia <input type="checkbox"/> problemi deambulazione	<input type="checkbox"/> stranguria <input type="checkbox"/> pollachiuria <input type="checkbox"/> ritenzione urinaria <input type="checkbox"/> ostruzione urinaria	<input type="checkbox"/> tenesmo rettale <input type="checkbox"/> diarrea <input type="checkbox"/> stipsi <input type="checkbox"/> dimagrimento <input type="checkbox"/> disoressia/ anoressia <input type="checkbox"/> problemi deambulazione	<input type="checkbox"/> stranguria <input type="checkbox"/> pollachiuria <input type="checkbox"/> ritenzione urinaria <input type="checkbox"/> ostruzione urinaria
---	--	---	--

Esami eseguiti:

- Visita Compilare cartella EOG ed EOP di Fenice
- Prelievo di Raccogliere 2 provette marroni da 2.6 ml, centrifugarle e
sangue congelare il surnatante
- Prelievo di Raccogliere la III frazione, centrifugarla e congelare il surnatante
sperma
- Esame REFERTO:
ecografico Prostata: _____

Cisti (dimensione/ posizione/ numero)

Testicoli: Dx _____

Sx _____

Esame obiettivo particolare dell'apparato riproduttore

Ciascun animale è stato sottoposto ad esame obiettivo generale (EOG) ed esame obiettivo particolare (EOP) dell'apparato riproduttore, con particolare attenzione alla palpazione dei testicoli per escludere la presenza di concomitanti patologie.

L'EOP a carico dei testicoli si basa sulla palpazione delle gonadi compiuta mantenendo il soggetto in stazione e servendosi d'entrambe le mani, analizzando così una gonade alla volta: con una mano s'esplora il testicolo mentre con l'altra lo si tiene stretto in quanto la gonade è mobile all'interno dello scroto e sfugge alle manualità. È essenziale palpare anche gli epididimi ed il funicolo spermatico (il plesso pampiniforme e il deferente).

L'EOP relativo alla prostata si basa sull'esplorazione digito-rettale dell'organo (la tecnica d'esecuzione è stata descritta nel paragrafo 3.1) al fine di esaminarne le dimensioni, la simmetria, la forma, la consistenza e l'eventuale dolorabilità.

Esame ecografico della prostata e dei testicoli

Per l'esecuzione dell'esame ecografico il soggetto è stato posto in decubito laterale destro ed è stata utilizzata una sonda settoriale multifrequenza da 7.5-10 MHz.

In seguito alla tricotomia, sono state valutate le gonadi separatamente, utilizzando la controlaterale come distanziatore. Mediante tale esame è stata valutata la dimensione delle gonadi, l'aspetto del parenchima testicolare, se normale o patologico, e l'eventuale presenza di noduli. Soltanto i cani con gonadi nella norma sono stati inclusi nello studio.

L'esame ecografico della prostata è stato eseguito come riportato nel paragrafo 3.3 allo scopo di diagnosticare eventuali patologie prostatiche.

Raccolta del materiale seminale, valutazione e stoccaggio

Ogni cane è stato sottoposto ad un singolo prelievo manuale di materiale seminale con vagina artificiale, eseguito in un ambiente calmo e tranquillo ma in assenza di cagna in estro.

La prima e la seconda frazione dell'eiaculato sono state raccolte insieme nella medesima provetta preriscaldata, mentre la terza frazione è stata raccolta separatamente dalle prime due. Per ogni cane è stato raccolto un volume di almeno 1 ml della terza frazione.

L'eiaculato presente nella prima provetta, dato dall'insieme della prima e della seconda frazione, è stato immediatamente sottoposto a valutazione dal punto di vista macro- e microscopico. I parametri macroscopici valutati sono stati: il colore, l'odore e la densità. I parametri microscopici valutati sono stati: il volume (ml), la motilità percentuale, il movimento, le forme patologiche e la concentrazione (milioni/ ml).

Il volume (ml) è stato stimato con l'aiuto di una pipetta calibrata a volume variabile. La motilità percentuale (0-100%) ed il movimento (punteggio da 0 a 5) sono stati valutati ad un ingrandimento di 400 X, mentre la morfologia ad un ingrandimento di 1000 X, utilizzando un microscopio a contrasto di fase equipaggiato con una piastra riscaldata. La concentrazione spermatica (milioni/ml) è stata valutata servendosi di una camera di Bürker.

La terza frazione dell'eiaculato è stata sottoposta a centrifugazione a 5000 G per 10 minuti. Il surnatante così ottenuto, cioè il plasma seminale, è stato aspirato senza intaccare il pellet, ed è stato stoccato in piccole aliquote da 0,5 ml conservate a -80 C°, fino all'esecuzione delle successive analisi biochimiche.

Determinazione della concentrazione delle proteine totali nel liquido seminale

La determinazione delle proteine totali nel liquido seminale è stata effettuata mediante analizzatore automatico OLYMPUS AU 400.

Per la determinazione delle proteine totali nel materiale seminale è stato utilizzato il metodo colorimetrico al rosso di pirogallolo.

Principio del test: il rosso di pirogallolo si combina con il molibdato per formare un complesso rosso con assorbanza alla lunghezza d'onda di 470 nm. Il test si basa sulla variazione nell'assorbimento che si ha quando il complesso rosso di pirogallolo-molibdato lega i gruppi amminici basici delle molecole proteiche, dando origine ad un complesso di colore blu-porpora che assorbe alla lunghezza d'onda di 600 nm. L'assorbanza di questo complesso è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteina nel campione.

Linearità: il test è lineare per concentrazioni 1 - 200 mg/dl, con un livello di sensibilità minima stimato a 0,7 mg/dl.

Reagenti: rosso di pirogallolo 47 μ mol/l, molibdato di sodio 320 μ mol/l, acido succinico 50mmol/l, benzoato di sodio 3,5mmol/l, ossalato di sodio 1mmol/l, metanolo 0,8%.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE)

Tale metodica permette un'analisi qualitativa di una miscela di proteine, separandole in base alle loro dimensioni, parametro correlato alla massa molecolare relativa. La tecnica si basa infatti sulla capacità del detergente sodio-dodecil-solfato (SDS) di denaturare le proteine e di legarsi agli aminoacidi, fornendo carica negativa netta a tutte le proteine presenti, in modo da separarle solo in base al loro peso molecolare.

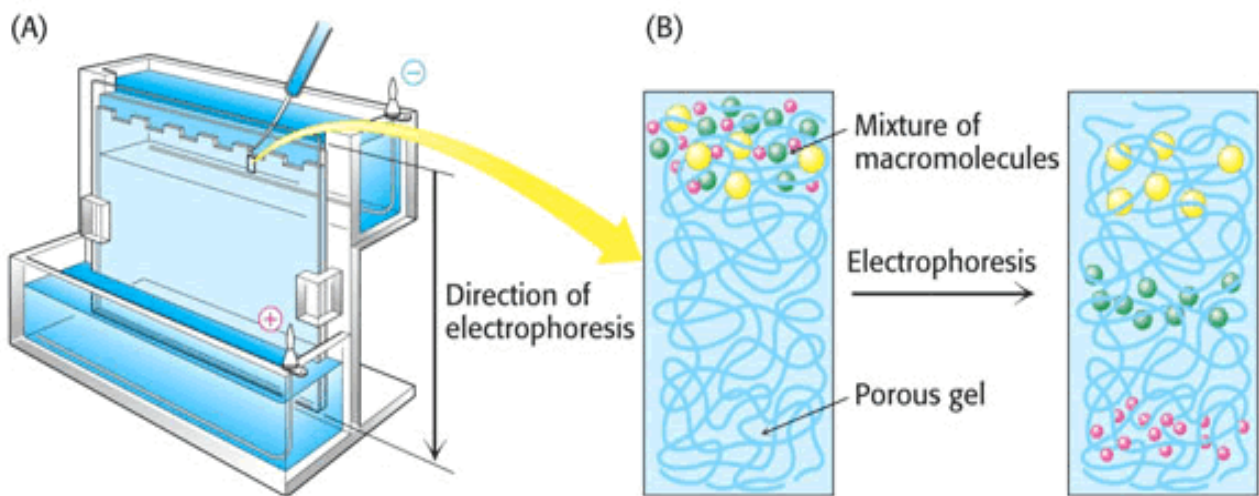


Figura 4.8: Schema semplificato della separazione di proteine in elettroforesi.

Messa a punto del protocollo sperimentale di separazione delle proteine in SDS-PAGE

Per la standardizzazione della metodica che in seguito descriveremo, sono state effettuate diverse prove di separazione delle proteine in elettroforesi, utilizzando gel a differenti % di acrilamide e tamponi diversi. La metodica è inoltre stata saggiata caricando sul gel campioni di plasma seminale contenuti differenti quantità di proteine. In particolare, inizialmente sono stati caricati campioni contenenti 20 μg di proteine, ma tale quantità si è rivelata eccessiva; di conseguenza è stata ridotta a 10 μg di proteine per campione (Figura 4.9)

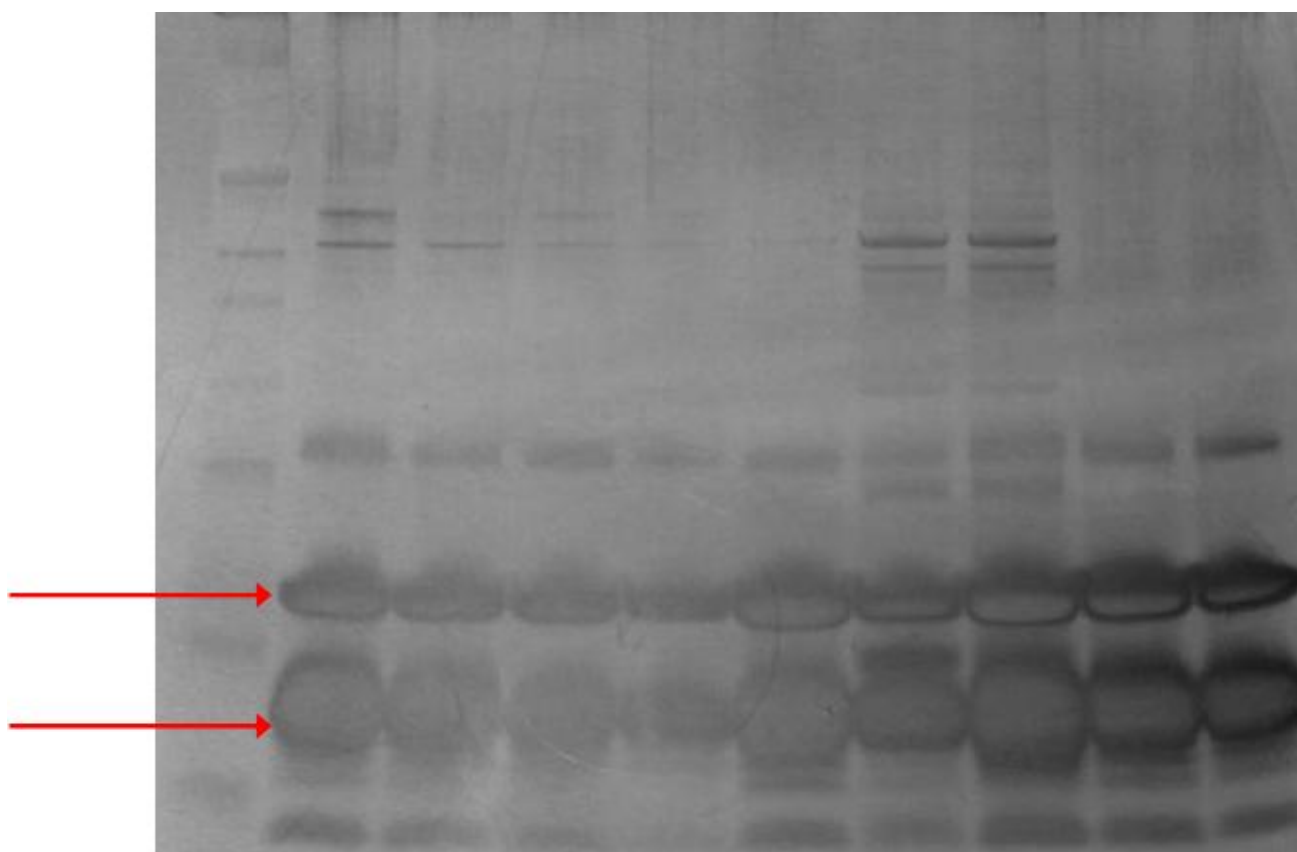


Figura 4.9: Gel al 4-12% di acrilamide, tampone MES. Sono stati caricati campioni di plasma seminale di cane contenenti 20 μg di proteine ciascuno. Si noti come tale quantità di proteine risulti eccessiva; le frecce indicano le due bande proteiche dove è più evidente il problema.

Durante le prove di separazione delle proteine del plasma seminale sono stati utilizzati il gel al 10% e 4-12%, sia con tampone MOPS che MES, ed anche il gel al 16% con tampone MES. Quest'ultimo ci avrebbe permesso di separare le proteine a basso peso molecolare (quelle più abbondanti nel plasma seminale di cane), ma purtroppo si sono verificati ripetutamente dei problemi durante la corsa elettroforetica dei campioni, e non abbiamo ottenuto i risultati sperati. Per questo la scelta del gel per la separazione delle proteine a basso peso molecolare è ricaduta, come riportato di seguente, sul gel al 14% di acrilamide.

Protocollo per la separazione delle proteine in SDS-PAGE

Sono stati analizzati un totale di 50 campioni di plasma seminale, sottoposti alla corsa elettroforetica in due gel differenti, rispettivamente al 10% (NuPAGE Bis-Tris Gel 1.0 mm- Invitrogen) ed al 14% di acrilamide (Progel Tris Glycin 1.0 mm-Anamed). Il numero dei campioni analizzati è minore rispetto al totale dei campioni raccolti (80) poiché una parte di essi è stata utilizzata per la messa a punto del protocollo sperimentale di separazione delle proteine in SDS-PAGE.

Una volta normalizzati i campioni a seconda della quantità di proteine totali in essi contenuti, sono stati presi 10 µl di ogni campione contenenti 10 µg di proteina, ad essi sono stati aggiunti 6 µl di loading buffer LDS (4x), 2,4 µl del reducing agent (10x) e 5,5 µl di acqua ultrapura.

I campioni così ottenuti sono stati incubati a 70 C° per 10 minuti ed in seguito centrifugati per 1 minuto. A 70 C° il reducing agent ha la funzione di ridurre i ponti disolfuro eventualmente presenti, che tengono insieme la struttura terziaria della proteina. Le proteine quindi si denaturano e si aprono a formare una struttura filamentosa avente una serie di molecole di SDS cariche negativamente lungo la catena polipeptidica, tale carica negativa è loro fornita dal loading buffer. La permanenza della struttura filamentosa è assicurata dalla repulsione fra le cariche negative, dislocate sulla catena proteica, che si crea ad ogni tentativo di chiusura della struttura filamentosa stessa. In questo modo le proteine, avendo tutte carica netta negativa, migrano in elettroforesi in funzione della loro massa molecolare.

Nel primo pozzetto di ogni gel è stato caricato uno standard (5 µl) contenente una miscela di proteine a peso molecolare noto (Protemix, Protein standard - Anamed), mentre nei restanti 9 pozzetti è stata caricata una dose pari a 20 µl di ogni campione.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (*SDS-PAGE*) è stata eseguita in una mini-cella SureLock (Invitrogen Italia S.R.L. - San Giuliano Milanese, MI Italia). Per il gel al 10% è stato utilizzato il MOPS come soluzione tampone, mentre per il gel al 14% un tampone tris-glicina a pH 8.3.

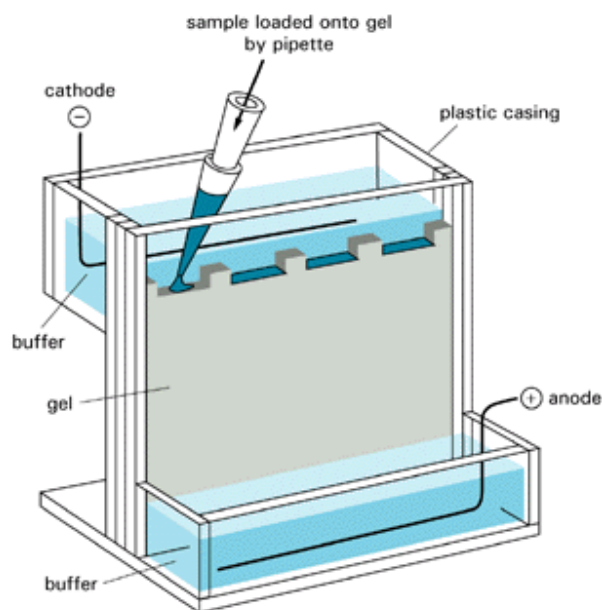
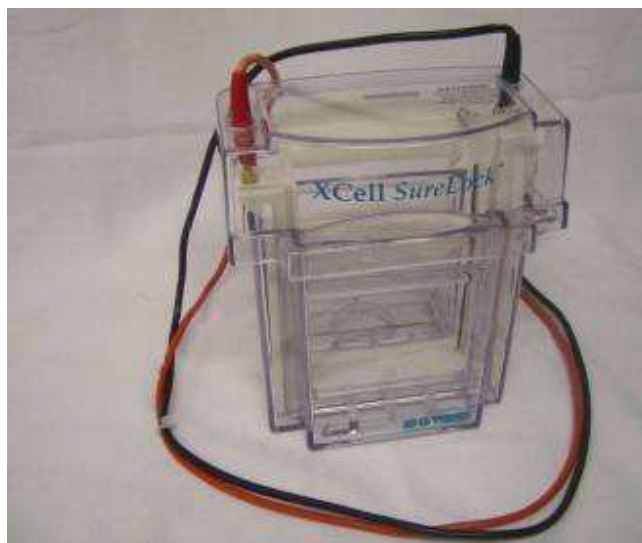


Figura 4.10: Immagine della mini-cella SureLock (Invitrogen Italia S.R.L. - San Giuliano Milanese, MI Italia) e schema semplificato del caricamento dei campioni nei diversi pozzetti.

La cella elettroforetica è stata connessa ad un alimentatore (Power Pack Basic – Bio-Rad, Hercules, CA USA) con voltaggio costante di 200 V per 40 minuti per i gel al 10%, e con voltaggio costante di 180 V per 1 ora e 30 minuti per i gel al 14%.

I gel al 10% sono stati colorati utilizzando il colorante Silver Quest (Silver staining kit-Invitrogen), seguendo il protocollo standard, mentre i gel al 14% sono stati colorati utilizzando il Comassie Brilliant Blue seguendo il protocollo standard. Il gel al 10% ci permette di separare in modo accurato le proteine ad alto peso molecolare, che nel cane risultano meno abbondanti rispetto a quelle di basso peso molecolare, ben separate nel gel al 14%. Per questo motivo per la colorazione del gel al 10% si è preferito utilizzare un colorante altamente sensibile come il Silver Quest.

Protocollo per la colorazione con Silver Quest

Durante tutti i passaggi il gel deve essere mantenuto in costante agitazione:

- Lavaggio rapido del gel con acqua ultrapura, seguito da 2 passaggi di 5 minuti ciascuno del gel in 100 ml di acqua ultrapura.
- Fissaggio del gel in 100 ml della soluzione di fissaggio per 20 minuti. *Composizione della soluzione di fissaggio: 40% etanolo / 10% acido acetico / 50% acqua ultrapura.*
- Togliere la soluzione di fissaggio e aggiungere una soluzione al 30% di etanolo per 10 minuti.
- Eliminare la soluzione di etanolo e aggiungere 100 ml della Sensitizing solution per 10 minuti. *Composizione della Sensitizing solution: 30 ml etanolo, 10 ml del sensitizer, aggiungere acqua ultrapura fino al raggiungimento di 100 ml.*
- Togliere la Sensitizing solution e aggiungere una soluzione al 30% di etanolo per 10 minuti.
- Togliere la soluzione di etanolo e lavare il gel in 100 ml di acqua ultrapura per 10 minuti.
- Togliere la soluzione di lavaggio e aggiungere 100 ml della Staining solution per 15 minuti. *Composizione della Staining solution: 1 ml di Stainer e 99 ml di acqua ultrapura.*
- Togliere la Staining solution ed eseguire un passaggio veloce del gel in 100 ml di acqua ultrapura per 45 secondi.
- Incubare il gel in 100 ml della Developing solution per 4-8 minuti finché le bande proteiche iniziano ad apparire e l'intensità di colore richiesta di suddette bande è raggiunta. *Composizione della Developing solution: 10 ml di Developer, 1 goccia di Developer enhancer e aggiungere acqua ultrapura fino al raggiungimento di 100 ml.*
- Quando l'intensità di colore richiesta delle bande proteiche è raggiunta, aggiungere, senza togliere la Developing solution, 10 ml di Stopper ed incubare per 10 minuti.
- Infine eseguire un lavaggio del gel in 100 ml di acqua ultrapura.

Protocollo per la colorazione con Coomassie Brilliant Blue

- Immergere il gel nella Fixing solution per 30 minuti.
- Immergere il gel nella Blue Coomassie solution e lasciarlo a colorare per 10-15 minuti.
- Sciacquare con 100 ml di acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante.
- Decolorare il gel con la Destaining solution, cambiare una volta la soluzione e lasciare decolorare il gel per una notte.
- Sciacquare il gel con acqua distillata.

Separazione delle proteine del liquido seminale mediante gelfiltrazione

La gelfiltrazione è una metodica che permette la separazione di molecole, sulla base della loro dimensione molecolare e della loro forma, sfruttando le proprietà di setaccio molecolare di particolari composti organici polimerici. Nel nostro studio il polimero utilizzato è il destrano, il cui nome commerciale è Sephadex; in particolare è stata usata la resina Sephadex G-75 che permette di separare le proteine con peso molecolare non superiore a 75 kDa. Il numero totale dei campioni analizzati con tale metodica è di 30.

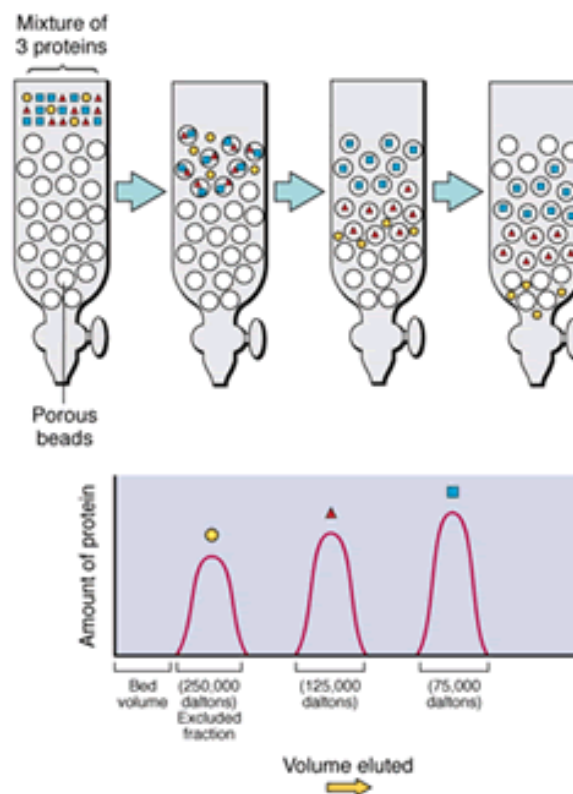


Figura 4.11: Schema semplificato della cromatografia per gel-filtrazione.

Preparazione della colonna

La resina è stata messa ad imbibire per 24 ore in un tampone di Tris HCl 20mM a pH 8.6. Dopo l'eliminazione delle bolle d'aria con l'aiuto di una pompa da vuoto, la resina è stata versata delicatamente lungo le pareti della colonna cromatografica di vetro, che era stata precedentemente lavata con HCl 1 N e acqua bidistillata.

Tale fase è da eseguirsi con particolare premura ed attenzione poiché è molto facile introdurre delle bolle d'aria nella resina; nel caso in cui ciò si verificasse il flusso del

tampone attraverso la colonna risulterebbe irregolare e la separazione delle diverse molecole inefficace, inficiando quindi la metodica.

La resina è stata poi lasciata sedimentare in colonna eluendo con il tampone Tris HCl 20mM a pH 8.6, per un volume pari a circa tre volte il volume della colonna. A protezione del letto formato dalle resina, è stato posto un sottile film di Sephadex G-25. Per valutare il volume vuoto (risultato essere di 4,5 ml), è stato invece introdotto in colonna del Blu di Destrano (PM 2.000 kDa) che, dato il peso molecolare molto elevato, eluisce con il volume vuoto della colonna.

Il tampone utilizzato per l'eluizione dei campioni è lo stesso impiegato per la preparazione della colonna.

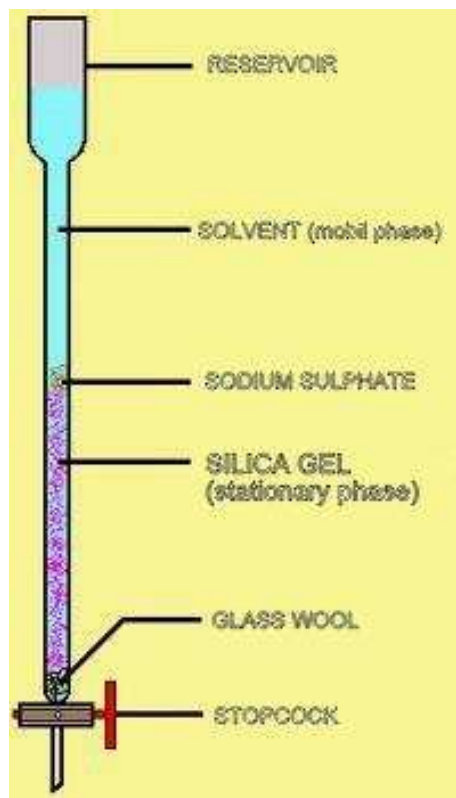


Figura 4.12: Schema semplificato della colonna per l'esecuzione della cromatografia per gel-filtrazione

Un volume di 300 μ l di plasma seminale di ogni campione analizzato è stato caricato nella colonna da cromatografia Sephadex G-75 (0.5 x 20 cm) preparata seguendo il protocollo descritto. La pressione operativa è la distanza in centimetri che intercorre fra

il livello superiore del tampone immesso nella colonna e il punto in cui la fase mobile esce dalla colonna stessa. Tale pressione idrostatica determina il flusso della colonna.

All'uscita della colonna è stato posto un portaprovette con le relative eppendorf numerate da 1 a 30. In ciascuna eppendorf è stato raccolto un ugual volume della fase mobile pari a 12 gocce, equivalenti a circa 0.5 ml di fase mobile. Ogni frazione è stata poi analizzata per il contenuto in zinco tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico.

Deteminazione della concentrazione di Zn mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico (AAS)

La concentrazione dello zinco è stata determinata mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico a fiamma (spettrofotometro IL, U.S.A., modello 11), con atomizzazione del campione e lettura alla lunghezza d'onda d'assorbimento dello zinco (213.9 nm).

Il campione in soluzione viene aspirato in fiamma dove è convertito in vapore atomico; la maggior parte degli atomi rimangono allo stato fondamentale e sono perciò in grado di assorbire radiazioni di una certa lunghezza d'onda che vengono fornite da una lampada a catodo cavo contenente il relativo elemento analizzato.

Quando la lampada viene accesa, il gas in essa contenuto si ionizza e gli ioni, accelerati verso il catodo, lo bombardano provocando l'emissione di un vapore atomico in cui gli atomi di quell'elemento si trovano in uno stato elettronico eccitato. Nel tornare allo stato elettronico fondamentale, essi emettono radiazioni che attraversano la fiamma dove vengono assorbite dal vapore atomico generato dal campione in modo direttamente proporzionale alla concentrazione del metallo nel campione.

Poiché solo l'elemento testato può assorbire specificatamente tali radiazioni, tale metodo risulta specifico e sensibile, inoltre un monocromatore fa sì che giungano al rivelatore solo radiazioni della lunghezza d'onda selezionata.

Il valore della concentrazione del metallo in $\mu\text{g/ml}$ viene ottenuto mediante costruzione di una curva di taratura con un valore massimo dello standard di $1 \mu\text{g/ml}$ nel caso dello zinco.

Tabella 4.13 : Parametri strumentali utilizzati nella determinazione delle concentrazioni dello zinco (Zn).

Parametri	Lampada λ (nm)	Corrente lampada (mA)	Banda passante	Aspirazione campione	Assorbanza dello standard	Limite di rilevazione (mg/L)
Zn	213,9	3	1	5 ml/min	0,540	0,005

Per approfondire il frazionamento delle proteine del liquido seminale mediante gel-filtrazione, le frazioni eluite da due cromatografie sono state ulteriormente sottoposte a elettroforesi in SDS-page con gel al 12%.

Prima di caricare i campioni sul gel, è stata determinata la concentrazione delle proteine nelle singole frazioni mediante un kit commerciale (DC Protein assay- BIORAD) che si basa sul metodo Lowry *et al.* modificato (Lowry *et al.*, 1951):

- 1) A 100 μ l del campione, vengono aggiunti 500 μ l del reagente A (Tartrato di rame alcalino) e si pone il campione così ottenuto su vortex
- 2) In seguito si aggiungono 4 ml del reagente B (Reattivo di Folin) e si pone il campione così ottenuto su vortex
- 3) Si attendono 15 minuti a temperatura ambiente
- 4) La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante spettrofotometria e lettura dell'assorbanza a 750 nm. Sensibilità: 0,2 – 1,5 mg/ ml

Analisi statistica

I valori relativi ai parametri del materiale seminale (volume, motilità, movimento, % spermatozoi normali, concentrazione) ed alla concentrazione dello Zn (μ g/ml) e delle proteine totali (g/dL) sono stati espressi come valori medi \pm D. S.; e sono stati analizzati impiegando un t-test per variabili indipendenti o un Wald-Wolfowitz test, a seconda della distribuzione dei dati. Tutti i test sono stati elaborati mediante l'utilizzo del software Statistica for Windows (Star Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Un valore di $p < 0.01$ è stato considerato significativo.

4.2.2 Risultati

Caratteristiche del materiale seminale

Le caratteristiche del materiale seminale dei cani esenti da IPB e dei cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica sono riportate nella tabella 4.14.

Il seme dei cani esenti da IPB è caratterizzato da maggiore motilità ($p < 0.01$), movimento ($p < 0.01$) e concentrazione ($p < 0.01$), inoltre da una minore percentuale di forme patologiche presenti ($p < 0.01$). Il volume dell'eiaculato risulta invece simile per entrambi i gruppi di cani valutati ($p > 0.01$).

Tabella 4.14: Valutazione del materiale seminale di cani esente da IPB e cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica

Seme	Volume (ml)	Motilità (%)	Movimento (0-5)	Spermatozoi normali (%)	Numero totale di spermatozoi ($\times 10^6$)
Cani esenti da IPB	6.2 ± 3.1	88.4 ± 13.2 <i>a</i>	4.6 ± 0.79 <i>a</i>	86.7 ± 7.2 <i>a</i>	1917.7 ± 979.1 <i>a</i>
Cani affetti da IPB	7.1 ± 3.4	76.7 ± 13.1 <i>b</i>	4 ± 0.9 <i>b</i>	80.5 ± 8.4 <i>b</i>	1354.5 ± 709.9 <i>b</i>

Per ogni colonna *a* vs *b* risultano statisticamente differenti (Student t-test; $P < 0.01$).

Concentrazione dello zinco (Zn) e delle proteine nel materiale seminale

I valori medi relativi alla concentrazione dello Zn ($\mu\text{g/ml}$) e delle proteine (g/dL) nei due gruppi analizzati, cani esenti da IPB e cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica, sono riportati nella tabella 4.15.

Le concentrazioni di Zn variano da un minimo di $0,12 \mu\text{g/ml}$ ad un massimo di $1,38 \mu\text{g/ml}$, quelle delle proteine da un minimo di $0,57 \text{ g/dl}$ ad un massimo di $5,96 \text{ g/dl}$. Non è stata verificata alcuna differenza statisticamente significativa nella concentrazione di Zn e delle proteine fra il gruppo di cani esenti da IPB, ed il gruppo di cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica (Student t-test, $P < 0.01$).

Tabella 4.15: Valori medi relativi alla concentrazione dello Zn ($\mu\text{g/ml}$) e delle proteine (g/dL) nei cani esenti da IPB e nei cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica

	Zn ($\mu\text{g/ml}$)	Proteine totali (g/dl)
Cani esenti da IPB	0.51 ± 0.22 ($n = 14$)	2.46 ± 1.49 ($n = 14$)
Cani affetti da IPB (sintomatica o asintomatica)	0.5 ± 0.31 ($n = 16$)	2.86 ± 1.21 ($n = 16$)

Cromatografia per gel-filtrazione

Le proteine del plasma seminale sono state sottoposte a frazionamento mediante cromatografia per gel-filtrazione, in base al loro peso molecolare. Sulle frazioni così ottenute è stata determinata la concentrazione dello Zn con la spettrofotometria ad assorbimento atomico.

Profilo cromatografico del liquido seminale in cani esenti da patologia prostatica.



Figura 4.16: Si osserva il profilo del plasma seminale di cane esente da iperplasia prostatica benigna (IPB), analizzato mediante cromatografia su Sephadex G-75.

La freccia in posizione 9 indica il volume vuoto della colonna pari a 4,5 ml, calcolato sul volume di eluizione del blu di destrano (Peso molecolare di 2.000 kDa) (Figura 4.16). Nelle nostre condizioni sperimentali tutte le molecole con peso molecolare maggiore a 75 kDa eluiscono a partire da questa frazione.

La mancanza di un picco di eluizione dello Zn, evidente nell'intervallo compreso fra la frazione 9 e la frazione 12, indica che tale metallo non si lega, nel liquido seminale di cane esente da IPB, alle proteine di alto peso molecolare.

Nel cane sano esente da IPB lo Zn eluisce infatti con un solo picco (frazioni 13-17), legato alle molecole di peso molecolare intermedio, indicativamente di circa 30 kDa.

Le frazioni dalla 18 alla 23 sono riferibili a proteine a basso peso molecolare, e a questo livello non è presente alcun picco di Zn.

Infine alla frazione 29 eluiscono dalla colonna gli ioni liberi come indicato dalla freccia del sodio (Na); questo significa che la cromatografia è conclusa.



Figura 4.17: Altro esempio di profilo cromatografico di cane esente da iperplasia prostatica benigna (IPB).

Nell'esempio di profilo cromatografico di cane sano esente da IPB riportato nella figura 4.17, il picco dello Zn, pur presentandosi sempre nella medesima posizione della figura, risulta però più ampio ed anche la concentrazione del metallo risulta maggiore.



Figura 4.18: Altro esempio di profilo cromatografico di cane esente da iperplasia prostatica benigna (IPB).

Nel profilo cromatografico del campione riportato nella figura 4.18, risulta maggiormente evidente, rispetto ai profili cromatografici dei campioni precedenti, un piccolo picco di Zn in corrispondenza delle frazioni 17-19, tale picco potrebbe indicare il legame dello zinco a proteine di basso peso molecolare, minore di 20 kDa.

Profilo cromatografico del liquido seminale in cani con iperplasia prostatica benigna (IPB) asintomatica

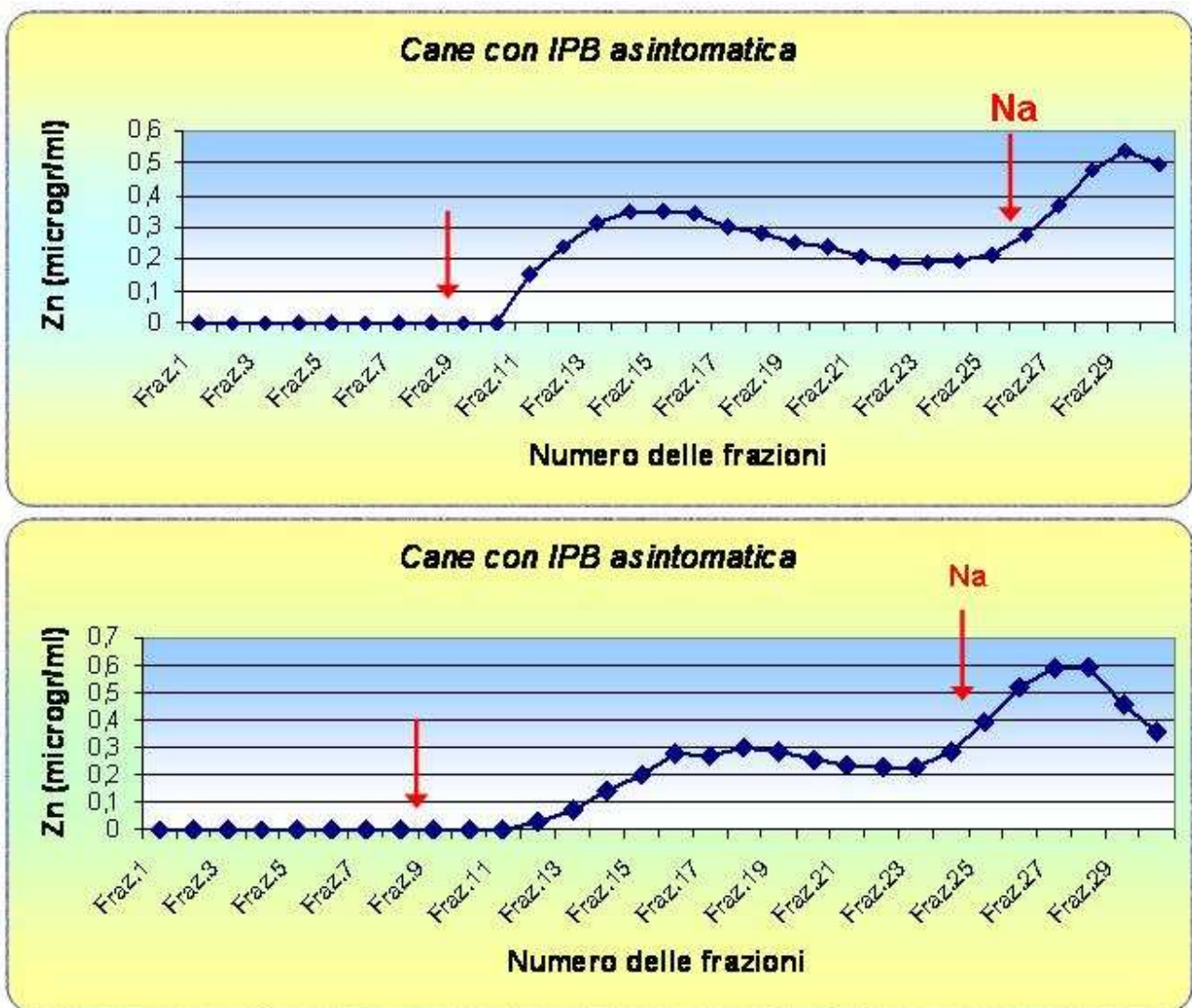


Figura 4.19: Si osserva il profilo cromatografico del plasma seminale di cani affetti da iperplasia prostatica benigna (IPB) asintomatica.

Nel profilo cromatografico dei campioni di plasma seminale di cani affetti da IPB asintomatica (figura 4.19) lo zinco si distribuisce in molte frazioni a partire dalla frazione numero 11, e non presenta un picco netto. Come nei campioni di plasma seminale di cani esenti da IPB, anche in quest'ultimi non è presente un picco di zinco legato a proteine ad alti pesi molecolari.

Profilo cromatografico del liquido seminale di cane in seguito a terapia atta a risolvere l'iperplasia prostatica benigna



Figura 4.20: Si osserva il profilo cromatografico del plasma seminale di un cane che era affetto da IPB sintomatica e che è stato curato con un ciclo di un mese e mezzo di finasteride, seguito dall'impianto sottocutaneo di deslorelina. Il prelievo del materiale seminale analizzato è avvenuto nel momento in cui il cane non presentava alcuna sintomatologia riferibile ad IPB, dopo 8 mesi circa dal posizionamento dell'impianto citato.

Il profilo cromatografico rappresentato nella figura 4.20, presenta un picco dello Zn che, come nei cani sani esenti da IPB, presenta una rapida ascesa e si ritrova nella medesima posizione (frazioni 13-17). A differenza del picco dello Zn presente nel profilo cromatografico di cani sani, in questo campione il picco dello Zn degrada con una lunga coda, molto più simile al profilo dei cani affetti da IPB asintomatica.

Profilo cromatografico del liquido seminale di cani affetti da iperplasia prostatica benigna (IPB) sintomatica (ematospermia)

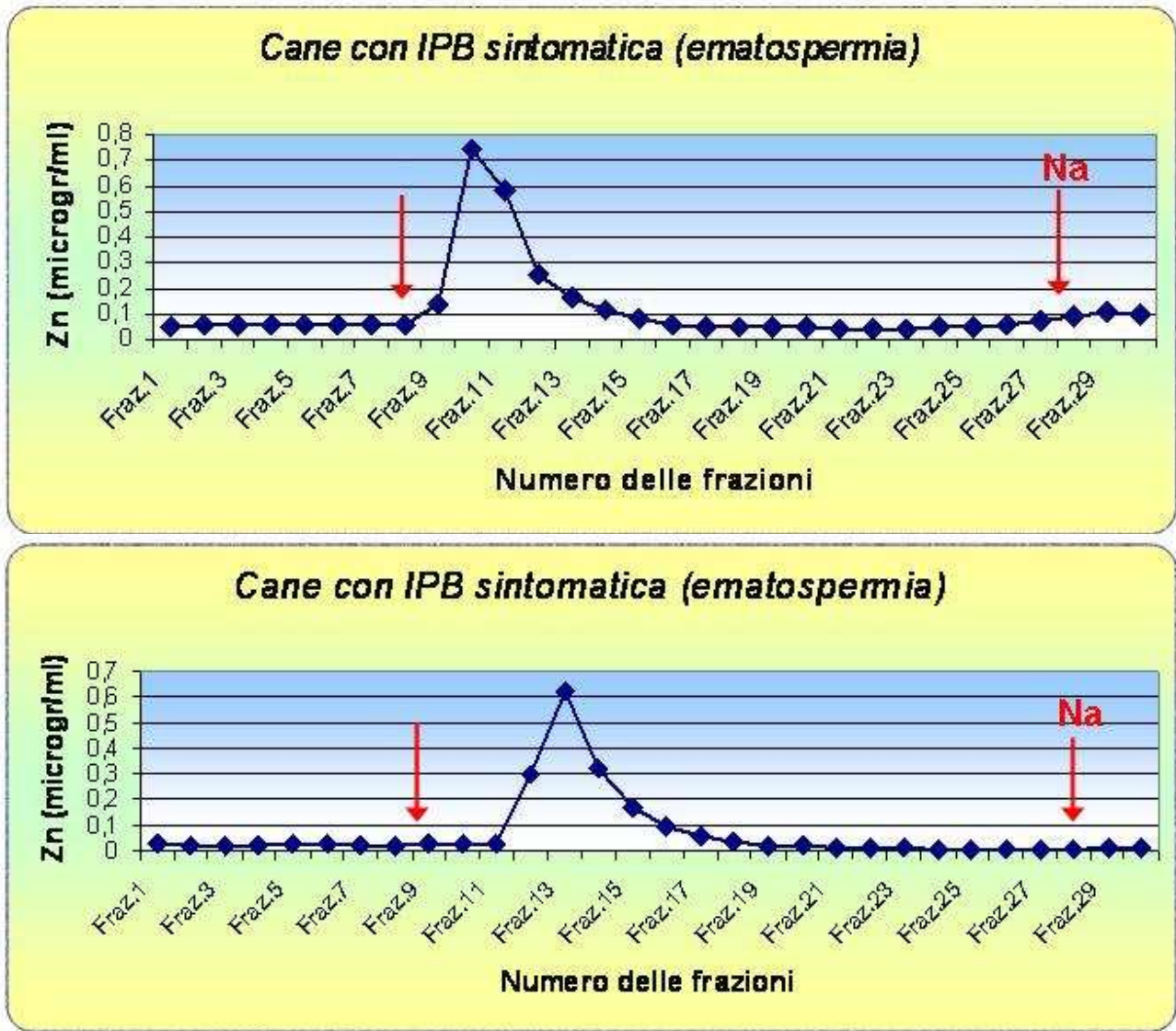


Figura 4.21: Si osserva il profilo cromatografico del plasma seminale di cani affetti da iperplasia prostatica benigna (IPB) sintomatica, in particolare presentanti ematospermia. I cani suddetti sono stati sottoposti al prelievo del materiale seminale prima dell'esecuzione di una terapia mirata al problema.

I profili cromatografici dei cani affetti da IPB sintomatica (ematospermia) rappresentati nella figura 4.21, presentano un picco dello Zn in posizione leggermente anticipata rispetto ai cani sani, in particolare a livello delle posizioni 9-13 (rispetto al picco in corrispondenza delle frazioni 13-17 dei cani sani). Tale riscontro fa presumere

un'interazione fra le proteine leganti lo zinco e l'emoglobina od altre eventuali proteine di origine ematica, presenti nei campioni.

Profilo cromatografico del liquido seminale di cane infertile



Figura 4.22: Si osserva il profilo cromatografico del plasma seminale di un cane infertile. Il soggetto è ritenuto infertile poiché, pur accoppiandosi con diverse femmine di fertilità nota, non ha mai dato esito a gravidanza; inoltre gli spermatozoi sono risultati affetti dal DAG defect.



Figura 4.23: Si osserva il profilo cromatografico del plasma seminale di un cane sospetto infertile. Il sospetto d'infertilità è sorto poiché da un anno a questa parte gli accoppiamenti del cane, con femmine diverse e di fertilità nota, non hanno dato esito a gravidanza. La valutazione del materiale seminale ha riportato astenozoospermia; inoltre il soggetto è risultato positivo a Brucella Canis.

Nei profili cromatografici del plasma seminale di cani infertili, rappresentati nelle figure 4.22 e 4.23, si nota l'assenza del picco dello Zn in corrispondenza degli alti ed intermedi pesi molecolari; mentre il metallo eluisce in corrispondenza dei volumi maggiori alla frazione 21; ciò indica che il metallo si trova legato a piccoli peptidi o è presente come ione libero.

Separazione delle proteine del plasma seminale con l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE)

Le proteine del plasma seminale di cane sono state separate con l' SDS-PAGE utilizzando gel a diversa percentuale di acrilamide e due differenti sistemi di colorazione, per ottenere una separazione ed una identificazione ottimale delle differenti frazioni proteiche presenti nei campioni.

Nel gel al 10% di acrilamide sono state identificate un numero di 18 bande proteiche totali; chiaramente non tutte le bande proteiche osservate sono presenti in ogni campione esaminato. È necessario precisare che nei campioni esenti da ematospermia il numero totale di bande proteiche è inferiore, in particolare se ne osservano soltanto 15. Nel gel al 14% di acrilamide sono state invece identificate un numero di 9 bande proteiche totali, anch'esse non presenti contemporaneamente in ciascuno dei campioni analizzati.

Nel gel al 10% di acrilamide fra le bande proteiche a peso molecolare maggiore quelle a 66 kDa e a 55 kDa sono presenti in tutti i campioni esaminati, mentre le bande proteiche a peso molecolare di 50 kDa e di 73 kDa sono presenti nella maggior parte di essi ma non nella totalità dei campioni analizzati. La banda proteica a peso molecolare di 75 kDa è presente in meno della metà dei campioni esaminati. Le bande proteiche a peso molecolare molto elevato pari a 97 kDa, 116 kDa e 120 kDa circa sono presenti soltanto nei campioni di cani recanti ematospermia.

Nel gel al 10% di acrilamide fra le bande proteiche a peso molecolare inferiore, quella a 29 kDa è presente in tutti i campioni e risulta la banda in assoluto più evidente. Costante comune a tutti i campioni analizzati, pur non essendo molto marcata, è anche la banda proteica a 18 kDa; mentre quella a 27 kDa è presente nella maggior parte di essi ma non in tutti i campioni analizzati. La banda proteica a peso molecolare di 36 kDa è ben evidente in tutti i campioni recanti ematospermia, ed è presente in tracce anche in qualcuno degli altri campioni esaminati.

Nei gel al 4-12% di acrilamide, eseguiti durante la messa a punto della metodica di separazione delle proteine, caricando una quantità maggiore di proteina, è stato possibile identificare delle bande proteiche a peso molecolare pari a 5 kDa e 10 kDa, che non sono state visualizzate nei gel al 10% successivamente eseguiti, poiché la tecnica è stata standardizzata caricando una minore quantità di proteina (la metà, per la precisione).

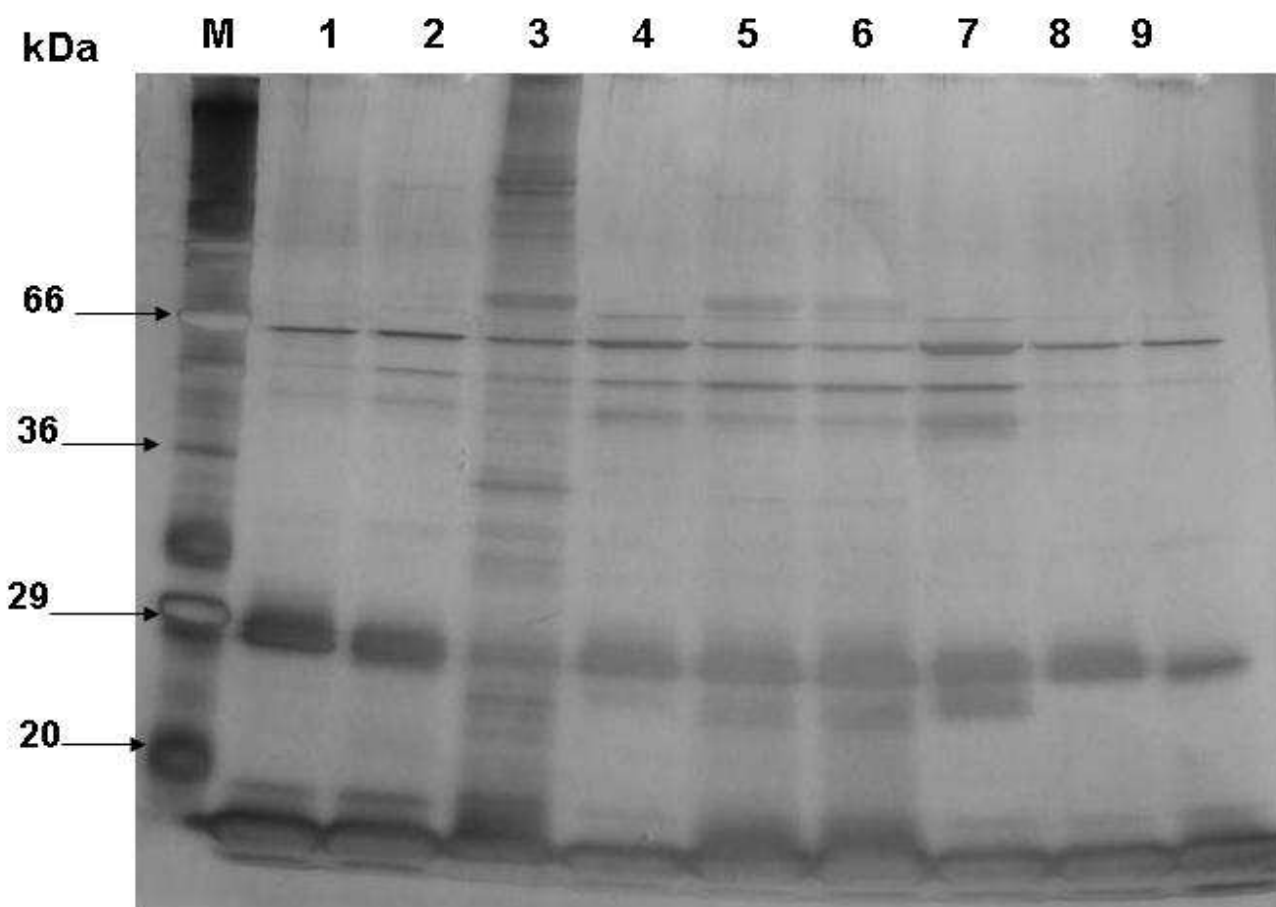


Figura 4.24: Esempio di gel al 10% di acrilamide, tampone MOPS. Da notare le bande proteiche a 66 kDa e a 55 kDa, presenti in tutti i campioni. Ben evidente inoltre la banda proteica a 29 kDa, anch'essa presente in tutti i campioni. Il terzo campione è di un cane con ematospermia: da notare la maggior quantità di bande proteiche presenti nel profilo elettroforetico, in particolare le bande proteiche ad elevato peso molecolare (P97, P116, e P120).

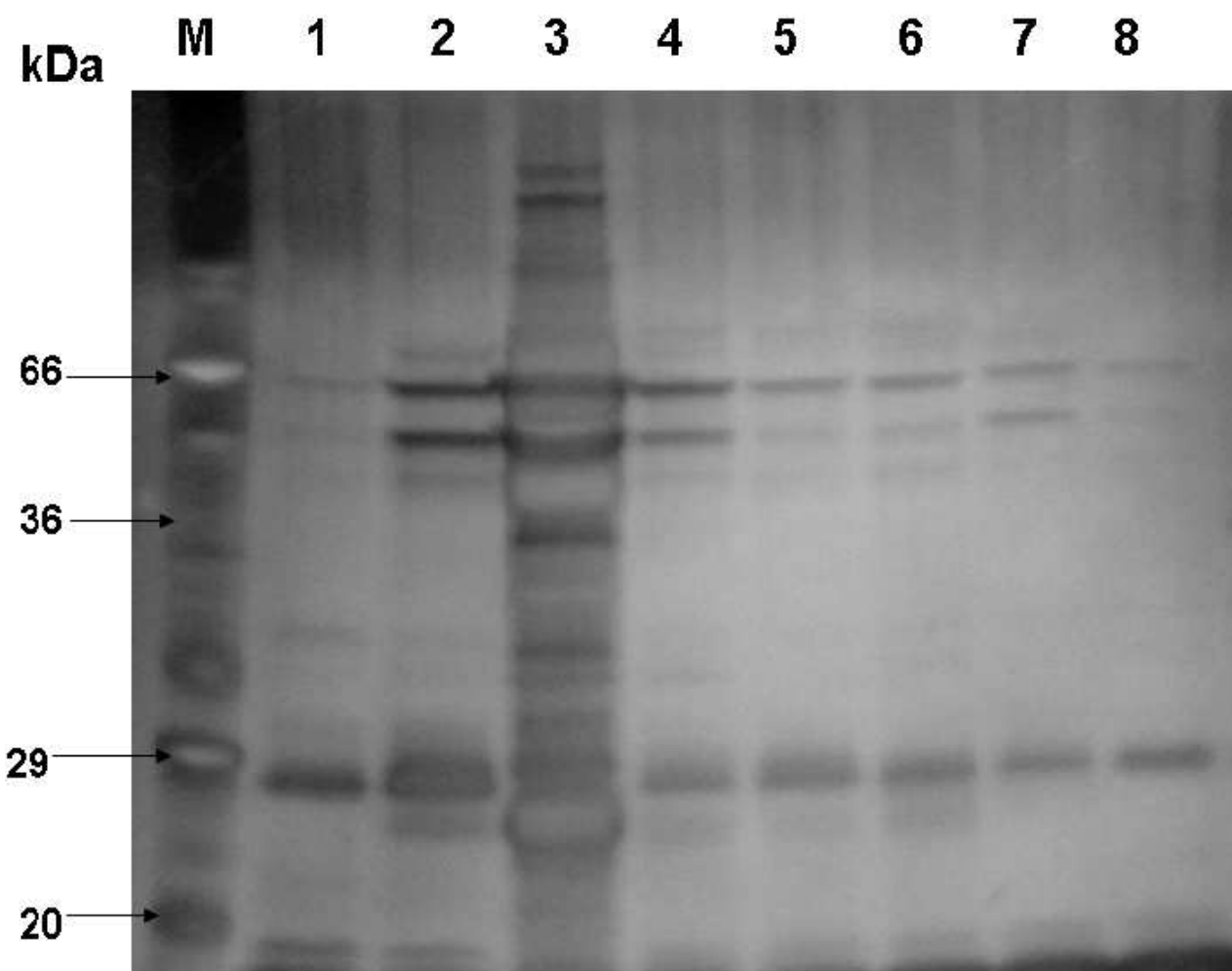


Figura 4.25: Altro esempio di gel al 10% di acrilamide, tampone MOPS. Da notare le bande proteiche a 66 kDa e a 55 kDa, presenti in tutti i campioni. Ben evidente inoltre la banda proteica a 29 kDa, anch'essa presente in tutti i campioni. Il terzo campione è di un cane con ematospermia grave: evidente il maggior numero di bande proteiche presenti nel profilo elettroforetico, in particolare le bande proteiche ad elevato peso molecolare (P97, P116, e P120).

Nei gel al 14% di acrilamide sono ben evidenti e presenti in tutti i campioni analizzati due bande proteiche di peso molecolare pari a 13 kDa e 15 kDa; tali bande proteiche sono in assoluto le più concentrate. Inoltre in tutti i campioni esaminati sono presenti le bande proteiche P66 e P29 come riportato per i gel al 10%. Le bande proteiche P50, P55, P75 appaiono debolmente visibili soltanto nei campioni con ematospermia e non negli altri, a causa della minore sensibilità della colorazione utilizzata per questo tipo di gel.

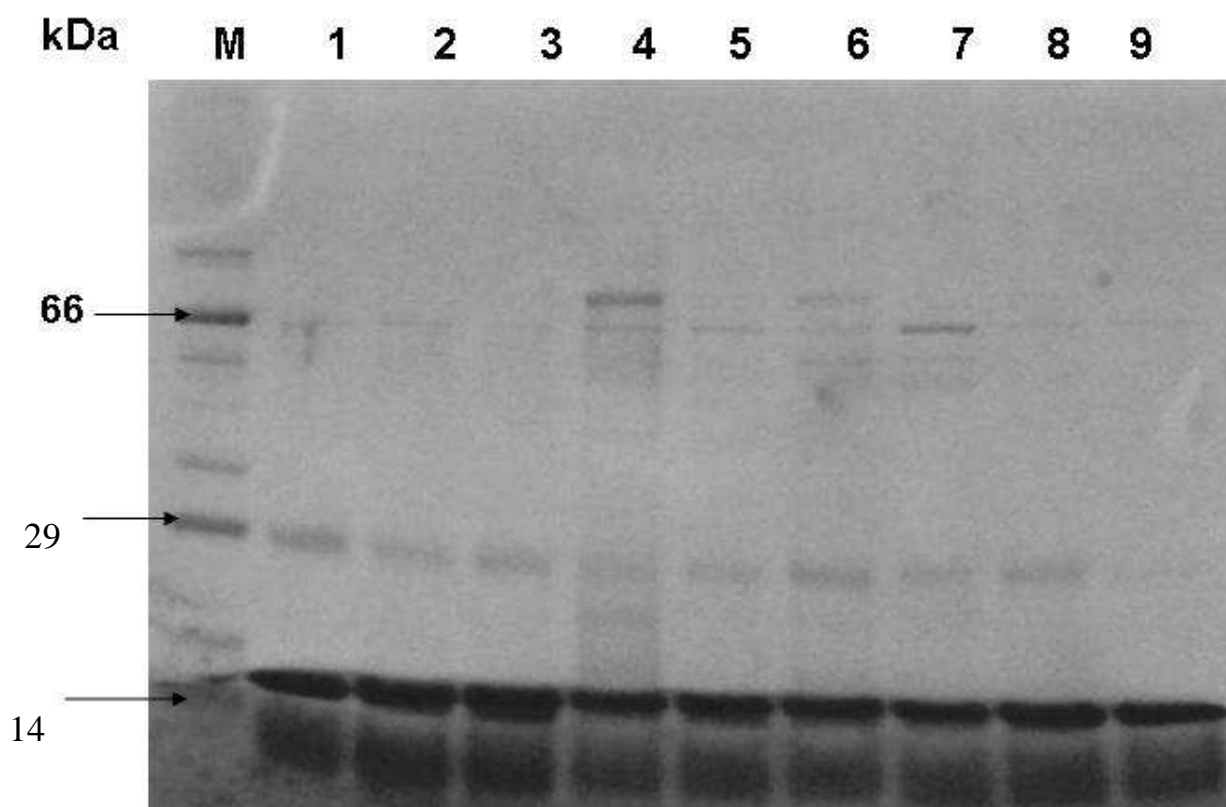


Figura 4.26: Esempio di gel al 14% di acrilamide, tampone tris-glicina a pH 8.3. Da notare le bande proteiche a 13 kDa e 15 kDa, molto concentrate ed evidenti in tutti i campioni analizzati. Costante comune in tutti i campioni risultano anche le bande P66 e P29.

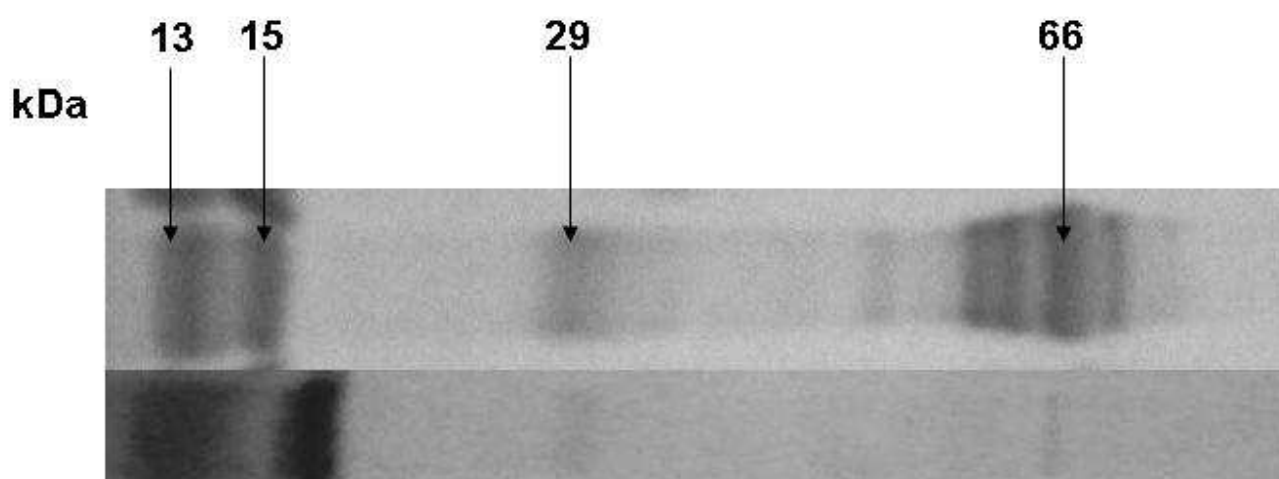
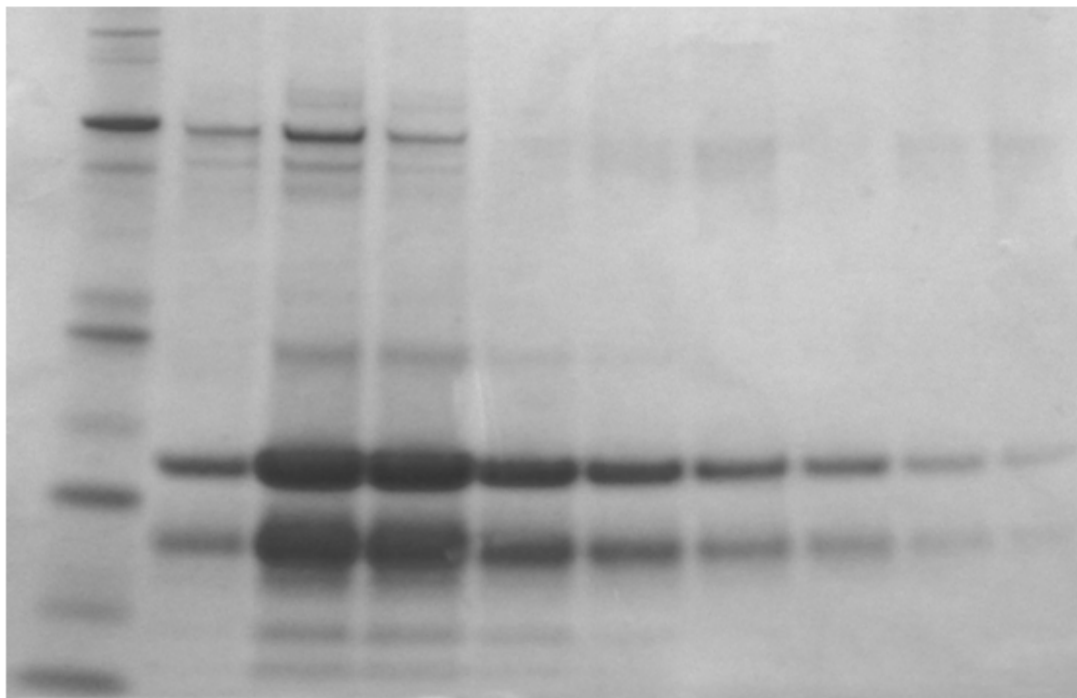


Figura 4.27: Profilo proteico di un cane con ematospermia grave (superiore) comparato con il profilo proteico di un cane esente da ematospermia (inferiore). Gel al 14% di acrilamide, tampone tris-glicina a pH 8.3. Da notare come le bande proteiche P66, P55, P50, P75 risultino più evidenti nel campione con ematospermia rispetto al campione di plasma seminale di cane sano.

Due campioni di plasma seminale, uno di un cane esente da IPB, l'altro di un cane sospetto infertile, sono stati analizzati all'elettroforesi con gel al 12% di acrilamide, tampone MES, dopo eluizione in cromatografia per gel-filtrazione. Le frazioni analizzate in elettroforesi sono solo alcune di quelle derivate da eluizione cromatografica.

Nelle figure 4.28 e 4.29 vengono riportati sia il profilo cromatografico (derivato dalla determinazione dello Zn nelle varie frazioni) che l'elettroforesi compiuta sulle frazioni 12, 13, 14, 16, 18, 20, 22, 26, 28 per il campione di cane esente da IPB (figura 4.28), e sulle frazioni 11, 13, 15, 17 per il campione di cane sospetto infertile (figura 4.29).



M 12 13 14 16 18 20 22 25 28

Figura 4.28: Nella figura in alto si osserva il profilo cromatografico di un cane esente da IPB. Le frecce rosse in corrispondenza delle frazioni 12 e 28 indicano l'intervallo delle frazioni eluite in cromatografia, che sono state successivamente analizzate in elettroforesi, gel 12% di acrilamide, tampone MES (figura in basso).

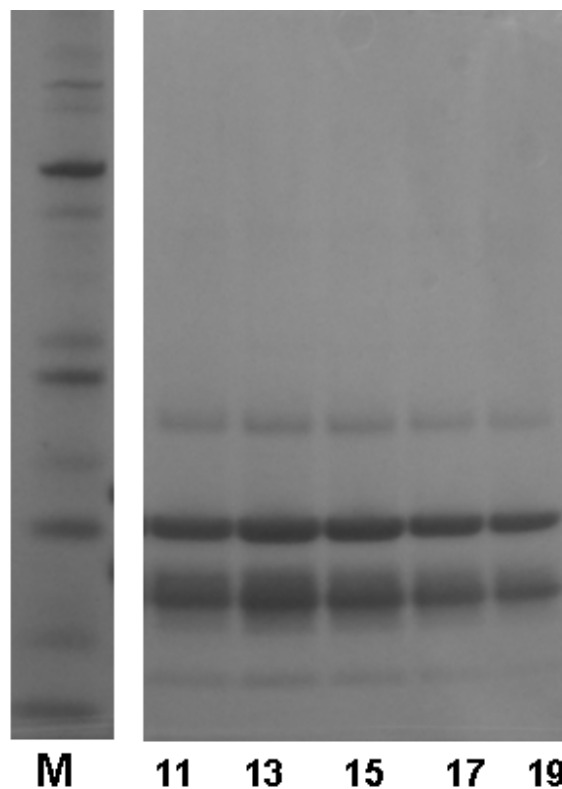


Figura 4.29: Nella figura in alto si osserva il profilo cromatografico di un cane esente da IPB. Le frecce rosse in corrispondenza delle frazioni 11 e 19 indicano l'intervallo delle frazioni eluite in cromatografia, che sono state successivamente analizzate in elettroforesi, gel 12% di acrilamide, tampone MES (figura in basso). Da notare come in tale soggetto sospetto infertile, rispetto al cane esente da IPB della figura 4.16 non siano presenti le bande proteiche di peso molecolare intermedio/alto dell'intervallo di 55-75 kDa.

4.2.3 Discussione

I risultati del nostro studio inerenti alle caratteristiche del materiale seminale di cani sani e cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica, sono nettamente in contrasto con quanto riportato in letteratura. Infatti dal nostro studio emerge che i cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica presentano un eiaculato caratterizzato da minor motilità, movimento, concentrazione e maggior numero di forme patologiche ($p < 0.01$), rispetto ai cani esenti da IPB. Il volume dell'eiaculato è l'unico parametro che non presenta differenza nei due gruppi. In letteratura invece si riporta che i cani affetti da IPB asintomatica presentano un eiaculato nella norma eccetto che per il minor volume (Barsanti, 1984). Anche nei cani recanti prostatiti croniche (E. Coli) la valutazione del materiale seminale è risultata nella norma (Barsanti *et al.*, 1986).

I valori dello Zn e delle proteine riscontrati nel cane sono più bassi rispetto a quelli riportati per le altre specie animali, infatti in letteratura si riportano valori da un massimo di 17.7 mg/dL nel plasma seminale di orso, ad un minimo di 1.3 mg/dL per la volpe (Massányi *et al.*, 2003). I valori dello Zn nel plasma seminale di cane risultano più bassi anche dei valori riportati per l'uomo ($488 \pm 18 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Markham *et al.*, 1994). Nei gruppi di cani esaminati (cani sani e cani con IPB sintomatica o asintomatica) non vi sono differenze significative fra le concentrazioni dello Zn e delle proteine totali. In letteratura è riportato che le prostatiti croniche del cane non alterano la quantità di Zn nello sperma (Barsanti *et al.*, 1986).

L'analisi in elettroforesi SDS-PAGE del plasma seminale di cane ha permesso di evidenziare 18 bande proteiche nel gel al 10% (15 bande proteiche totali nei campioni non ematospermici) e 9 nel gel al 14%, a peso molecolare intermedio/ basso; in particolare le più evidenti si concentrano a pesi molecolari inferiori a 29 kDa.

Nel nostro studio pertanto, ogni campione di plasma seminale di cane è stato sottoposto a due corse elettroforetiche impiegando due gel differenti (al 10% e 14% di acrilamide) con corrispettivi tamponi (rispettivamente il MOPS per il gel al 10% ed il tris-glicina a pH 8.3 per il gel al 14%), al fine di rendere ottimale anche la separazione delle proteine di peso molecolare inferiore. Nel gel al 10% i pesi molecolari delle bande proteiche osservate variano da un minimo di 18 kDa ad un massimo di 116 kDa, banda presente

soltanto negli eiaculati recanti ematospermia. Nel gel al 14% invece il range dei pesi molecolari riscontrati varia da 13 kDa a 75 kDa.

In letteratura si riporta il profilo proteico del plasma seminale di cane analizzato all'SDS-PAGE con gel al 13% ed al 22% di acrilamide (De Souza *et al.*, 2007). In questo studio gli autori identificano un numero totale di bande proteiche pari a 19 bande nel gel al 13% e 18 bande nel gel al 22%. Nel gel al 13% le bande da essi identificate, si distribuiscono in un range di pesi molecolari comparabile a quello da noi ottenuto: da un minimo di 17.1 kDa ad un massimo di 100.6 kDa. Nel nostro studio le bande proteiche raggiungono pesi molecolari maggior (116 kDa) poiché vi è l'interferenza data dalle proteine di origine ematica, presenti negli eiaculati ematospermici. Il gel al 22% invece, permette a De Souza *et al.* di identificare proteine a peso molecolare molto basso, fino ad un minimo di 3.6 kDa. In uno degli ultimi gel al 14% da noi eseguito, l'utilizzo di una colorazione Comassie modificata in soluzione acquosa (BIORAD), ci ha permesso però di evidenziare bande proteiche di peso molecolare pari a 5 kDa.

Il profilo proteico del liquido seminale di gatto analizzato all'SDS-PAGE presenta invece, un numero di bande nettamente superiore rispetto al cane, tali bande inoltre si concentrano in due precise aree del profilo elettroforetico: una, come nel cane, a peso molecolare inferiore a 22 kDa, l'altra a peso molecolare elevato, fra i 60 ed i 200 kDa (Zambelli *et al.*, 2010). Il toro e l'ariete presentano un numero totale di bande proteiche limitato, rispettivamente 12 nel primo e 22 nel secondo, concentrate ancor più che nel cane a basso peso molecolare, in particolare fra 10 e 25 kDa (Jobim *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2008). Anche il profilo proteico del plasma seminale di stallone presenta un basso numero di bande proteiche (14) ma recanti pesi molecolari variabili in un range assai più ampio: da un minimo di 14 kDa ad un massimo di 120 kDa (Frazer, 1996; Kareskoski *et al.*, 2008). Risulta quindi evidente che esiste una grande variabilità per quanto riguarda il profilo elettroforetico delle proteine nel liquido seminale dei mammiferi (figura 4.30).

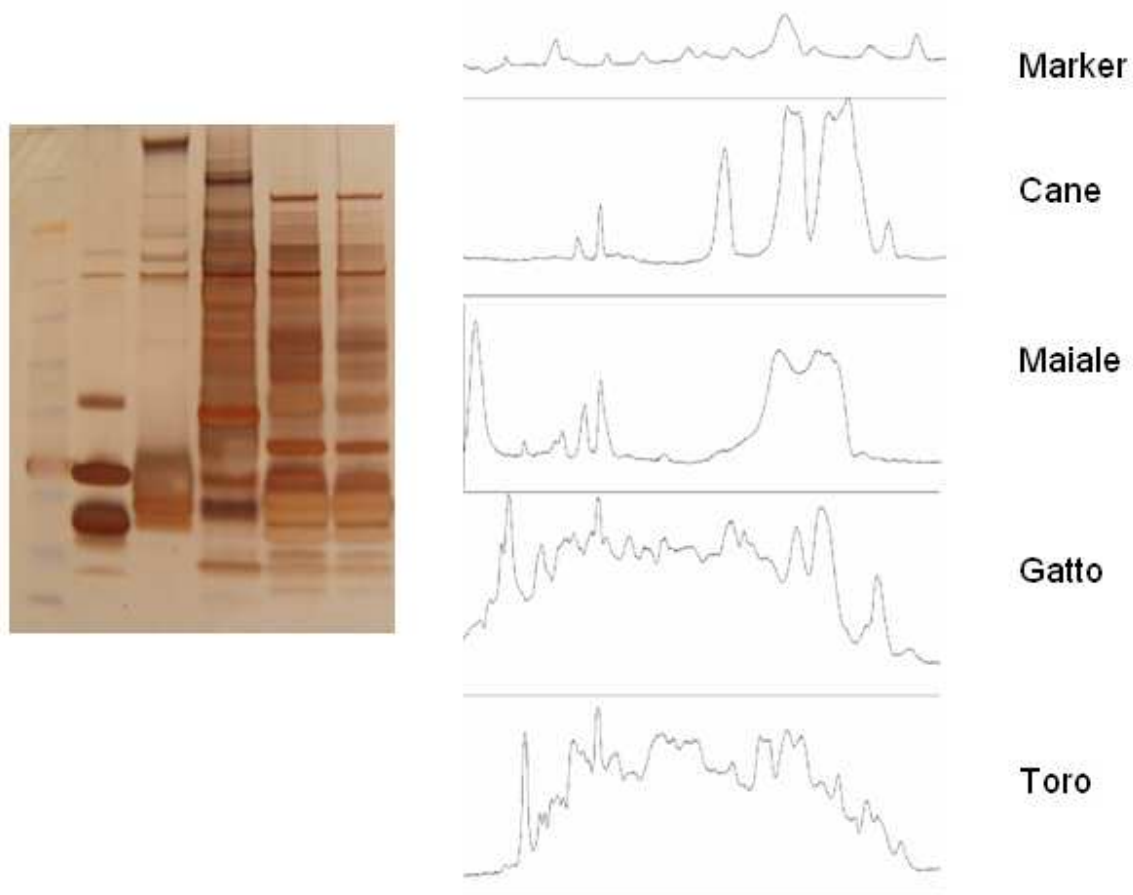


Figura 4.30: Comparazione fra i diversi profili proteici del plasma seminale analizzati all' SDS-Page nel cane, maiale, gatto e toro. Figura gentilmente concessa dalla Prof. Isani Gloria.

Nel nostro studio in tutti i campioni analizzati all' SDS-PAGE con entrambi i gel al 10% e 14% sono presenti le bande proteiche P66 e P29, la P55 e la P18 sono invece presenti in tutti i campioni esaminati impiegando per l'elettroforesi il gel al 10%, infine nei gel al 14% sono costantemente osservabili le bande proteiche P13 e P15.

La P66 mostra lo stesso peso molecolare dell'albumina, la proteina che risulta la più abbondante nel plasma ematico. La P66, pur essendo osservabile in tutti i campioni analizzanti, risulta maggiormente concentrata negli eiaculati recanti ematospermia. Tale riscontro conferma l'ipotesi che nel plasma seminale di cane possa essere presente albumina. Una banda proteica a peso molecolare di 67 kDa è stata identificata anche da De Souza (De Souza et al., 2006) ma non è risultata presente in tutti gli eiaculati analizzati. Anche nel gatto (Zambelli *et al.*, 2010) e nell'uomo (66.2 kDa) tale proteina

è osservabile in tutti i campioni esaminati (Li et al., 2010). Dalla figura 4.30 si nota come tale proteina sia presente negli eiaculati delle diverse specie esaminate.

Alla P29 si potrebbe attribuire un'origine epididimale, in quanto tale proteina è risultata assente nel plasma seminale di cani sottoposti a vasectomia (De Souza *et al.*, 2006).

La banda proteica alla quale nel nostro studio è stato attribuito peso molecolare di 55 kDa potrebbe essere comparabile alla proteina di 58.6 kDa, identificata essere una proteina legante eparina, probabilmente attiva nel processo della reazione acrosomiale degli spermatozoi di cane (De Souza, 2003). La P55 nel profilo proteico del plasma seminale di bovino è una delle due proteine, assieme alla P26, che è risultata positivamente correlata alla maggior fertilità dell'animale (Killian *et al.*, 1993). Se la proteina identificata nel cane è realmente implicata nella reazione acrosomiale degli spermatozoi, anch'essa potrebbe essere positivamente correlata alla fertilità del soggetto. Ulteriori studi sono necessari alla conferma dell'ipotesi effettuata.

La banda proteica da noi identificata P18 potrebbe essere comparabile alla proteina di peso molecolare 19.5 kDa identificata in tutti i campioni analizzati in SDS-PAGE con gel al 13% da De Souza (De Souza *et al.*, 2007), anche se nel gel al 14% del nostro studio tale banda proteica non è osservabile probabilmente a causa di una minore sensibilità della tecnica di colorazione. La P18 risulta costantemente presente anche nel profilo proteico del plasma seminale di stallone (Frazer *et al.*, 1996) ma riguardo alla sua funzione non è stata fornita alcuna ipotesi.

Nei profili proteici da noi ottenuti all'SDS-PAGE con gel al 14% sono sempre evidenti le bande proteiche P13 e P15, le più concentrate in assoluto del pattern elettroforetico. Tali bande proteiche con buone probabilità sono le due subunità dell'arginina esterasi, la proteina d'origine prostatica che rappresenta il 90% delle proteine del plasma seminale di cane (Kutzler, 2008). L'arginina esterasi presenta un peso di 29.5 kDa se analizzata in cromatografia per gel-filtrazione, e di 25 kDa se stimata all'SDS-PAGE; in condizioni denaturanti però, i ponti disolfuro che legano le due catene della molecola, si scindono dando origine a due subunità di peso molecolare pari a 12-14 kDa e 15 kDa (Isaacs e Shaper, 1983; Chapdelaine *et al.* 1984). L'arginina esterasi viene considerata un marker prostatico specifico, indice della funzionalità dell'organo, comparabile alla PSA per l'uomo. La PSA dell'uomo se analizzata in cromatografia per gel-filtrazione presenta un peso di 34 kDa, mentre all'elettroforesi si mostra come una banda proteica del peso

molecolare di 32 kDa (Waheed *et al.*, 2008). Il peso molecolare della PSA (32 kDa) quindi risulta vicino a quello dell'arginina esterasi del cane (25 kDa) (Isaacs e Shaper, 1983; Chapdelaine *et al.* 1984) ma nel profilo proteico del plasma seminale di cane, identificato nel nostro studio, non si osservano bande proteiche a peso molecolare compatibile con la PSA; possiamo quindi supporre che tali proteine, pur presentando notevole affinità, l'una nell'uomo, l'altra nel cane, siano distinte tra loro (Dubé *et al.*, 1986; Gobello *et al.*, 2002), anche se sarebbero necessari ulteriori approfondimenti diagnostici.

Nel nostro studio non è stato possibile trovare delle correlazioni positive fra la presenza di particolari bande proteiche nel profilo elettroforetico, e parametri relativi alla valutazione del materiale seminale. In letteratura si riporta invece che nel cane due bande proteiche (67 kDa e 58.6 kDa) siano positivamente correlate alla motilità, alla vitalità e alla percentuale di spermatozoi morfologicamente nella norma (De Souza *et al.*, 2007).

Il profilo proteico del plasma seminale nelle differenti specie animali è stato correlato a diversi parametri quali la stagionalità (Cardozo *et al.*, 2006), la fertilità (Killian *et al.*, 1993), la predisposizione al congelamento (Jobim *et al.*, 2004), le caratteristiche del materiale seminale (De Souza *et al.*, 2007); nel nostro studio abbiamo tentato di correlarlo alla presenza o meno di patologia prostatica (IPB sintomatica ed asintomatica). A differenza di quanto ottenuto con la cromatografia per gel-filtrazione, con quale è stato possibile identificare differenti profili per cani esenti da patologia prostatica, cani con IPB asintomatica, cani con IPB sintomatica (ematospermia) e cani infertili o sospettati tali; l'elettroforesi non ha permesso di identificare un profilo proteico, o per lo meno delle bande proteiche, comuni ai differenti gruppi citati.

Infatti ad esempio le P73, P75, P50, P27 sono presenti soltanto in alcuni dei campioni analizzati, indifferentemente che essi provengano da cani sani o cani affetti da iperplasia prostatica benigna. Nei quattro cani infertili esaminati però, risultano assenti nel profilo elettroforetico le bande proteiche a peso molecolare intermedio/alto (range 55-75 kDa). Tale riscontro è correlabile al profilo cromatografico ottenuto dai cani suddetti, in cui lo Zn sembra essere meno legato alle proteine ma maggiormente presente come ione libero (figura 4.29).

Possiamo concludere affermando che la cromatografia può essere una tecnica interessante per l'analisi del plasma seminale e può risultare di aiuto diagnostico nell'identificazione della patologia prostatica. Dallo studio emerge inoltre come la cromatografia per gel-filtrazione possa guidare il clinico verso la diagnosi dell'infertilità di un soggetto, percorso in genere estremamente lungo e frustrante. I cani esenti da IPB infatti, presentano un profilo cromatografico tipico, con un picco di Zn ben evidente in corrispondenza delle proteine a peso molecolare intermedio/ alto; nei cani infertili invece, non risulta un picco marcato del metallo che eluisce come ione libero alla fine della cromatografia. Ulteriori studi sono però necessari per confermare i risultati ottenuti, ampliando la casistica dello studio e l'attendibilità delle affermazioni riportate.

4.3 Studio 3: Aspetti Ormonali

4.3.1 Materiali e metodi

Raccolta dei campioni

In questo studio sono stati arruolati i cani precedentemente citati riguardo lo studio 2 sull'aspetto biochimico della prostata. In particolare sono stati selezionati un totale di 64 cani, divisi in due gruppi composti da 32 cani ciascuno. Il primo gruppo comprende cani sani esenti da iperplasia prostatica benigna (IPB), mentre il secondo gruppo comprende cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica. Tutti i cani erano esenti da concomitanti patologie testicolari.

Ogni cane esaminato è stato sottoposto a prelievo di sangue per la valutazione della concentrazione del 17- β estradiolo (E2), del testosterone (TST) e del progesterone (P4) plasmatici. Il prelievo è sempre stato eseguito dalla vena cefalica dell'arto anteriore sinistro.

Per l'esame sono stati prelevati circa 5 ml di sangue da ogni cane, raccolto in provette da siero da 2,6 ml l'una. Il campione è stato poi lasciato sierare per circa 30 minuti, ed in seguito sottoposto a centrifugazione per 10 minuti alla velocità di 10000 rpm. Il surnatante, cioè il siero ematico, così ottenuto è stato prelevato senza intaccare il pellet e riposto in un'ependorf, successivamente stoccata alla temperatura di -4 C° per l'esecuzione dei successivi dosaggi ormonali.

Analisi dei campioni

Le analisi sono state effettuate dai laboratori di Fisiologia Veterinaria del DiMorFiPa della Facoltà di Veterinaria dell'Università degli Studi di Bologna mediante saggio radioimmunologico (RIA). Per determinare la concentrazione plasmatica degli ormoni sono state seguite le tecniche riportate da Gaiani *et al.* (1979) e da Seren *et al.* (1974).

Il testosterone ed il progesterone sono stati dosati su tutti i 64 cani esaminati, mentre gli estrogeni sono stati valutati solo in 38 di essi (in 18 campioni del primo gruppo ed in 20 campioni del secondo gruppo). Soltanto per il dosaggio degli estrogeni è infatti necessario 1 ml di siero ematico; di conseguenza per i campioni in cui quest'ultimo

risultava insufficiente per la valutazione di tutti e tre gli ormoni, è stata data la precedenza al dosaggio del testosterone e del progesterone.

I valori relativi ai dosaggi del TST, del P4 e dell'E2 sono stati espressi come valori medi \pm D. S., e sono stati analizzati impiegando un t-test per variabili indipendenti o un Wald-Wolfowitz test, a seconda della distribuzione dei dati. Tutti i test sono stati elaborati mediante l'utilizzo del software Statistica for Windows (Star Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Un valore di $p < 0.01$ è stato considerato significativo.

Dosaggio radioimmunologico del testosterone

Per tale analisi ci si è avvalsi di un anticorpo anti-testosterone presentante le seguenti cross-reaction:

Testosterone	100%
DHT	25,4%
Dione	0,43%
Cortisolo	0%
Progesterone	0%

L'ormone è stato estratto dal campione di plasma (0.2ml) con 5 ml di etere etilico mediante agitazione su "rotor" per 30 minuti e centrifugazione a 2000g per 4 min. L'estratto etero è stato evaporato in corrente di aria a 37°C e sul residuo secco, ripreso con 0,4 ml di tampone fosfato (0.05M, pH 7.4 contenente 0.1% di BSA), è stato effettuato il dosaggio radioimmunologico.

Ad una aliquota di 0.1 ml, è stato aggiunto testosterone triziato (30 pg/tubo) e 0.1 ml di una soluzione 1:50.000 di anticorpo anti-testosterone, prodotto nel coniglio. La miscela è stata quindi incubata per 18 ore a +4°C. La separazione dell'ormone legato all'anticorpo dall'ormone libero è stata ottenuta mediante l'aggiunta di una soluzione di charcoal-destrano. Parallelamente agli estratti eteri plasmatici, il saggio è stato condotto su quantità note di ormone, onde allestire una curva di lettura. Il recupero medio, valutato in prove preliminari, è risultato dell'80%.

Dosaggio radioimmunologico del 17- β estradiolo

Per quest'analisi il tracciante radioattivo utilizzato è marcato nelle posizioni 2,4,6,7 ³H della molecola (NEN-New England Nuclear).

La specificità dell'anticorpo è espressa dalle reazioni crociate indicate in tabella.

Estradiolo 17 β	100%
Estrone-estriolo	0,3%
Estradiolo 17 α	0,1%
Colesterolo	< 0,0001%
Testosterone	< 0,0001%
Progesterone	< 0,0001%

Il 17 β -E₂ è stato estratto dal plasma (1,250 ml) con etere etilico (15 ml) mediante agitazione su “rotor” per 30 minuti e centrifugazione a 2000g per 4 minuti. Ai campioni di plasma sono state aggiunte inizialmente quantità note di estradiolo 17 β marcato con trizio onde poter valutare le eventuali perdite che si verificano durante il saggio (recupero). L’estratto etero è stato evaporato sotto flusso di aria a 37 °C e sul residuo secco, ripreso con 0,5 ml di tampone fosfato (0.05M, pH 7.4 contenente 0.1% di BSA), è stato effettuato il dosaggio radioimmunologico.

Ad una aliquota di 0,2 ml sono stati aggiunti 0,1 ml di 17 β -E₂ triziato (13,5 pg/tubo) e 0,1 ml di anticorpo diluito 1:40000. La miscela è stata quindi incubata per 18 ore a 4 °C. La separazione dell’ormone legato all’anticorpo da quello libero è stata ottenuta mediante l’aggiunta di 1 ml di una soluzione all’1% di Charcoal e 0,025% di destrano. Dopo incubazione a 4 °C per 15 min. il Charcoal è stato precipitato mediante centrifugazione a 4000g per 4 min. e il surnatante è stato versato in vials da scintillazione e quindi contato in un beta-counter Packard modello TRI-CARB 4000. Parallelamente il saggio è stato condotto su quantità note dell’ormone onde allestire una curva di lettura (3-250 pg/0,1 ml). Il recupero medio è risultato essere dell’80%.

Dosaggio radioimmunologico del Progesterone

Per quest’analisi il tracciante radioattivo utilizzato è marcato nelle posizioni 1,2,6,7,16,17- ³H della molecola (NEN-New England Nuclear).

La specificità dell’anticorpo è espressa dalle reazioni crociate indicate in tabella.

Progesterone	100%
11- α -OH-progesterone	83,3%
- β -OH-progesterone	15,7%
17- α -OH-progesterone	1,7%
20- α -OH-progesterone	<0,1%

Il progesterone è stato estratto dal plasma (0,2 ml) con etere di petrolio (5 ml) mediante agitazione su “rotor” per 30 minuti e centrifugazione a 2000g per 4 minuti. Al campione di plasma sono state aggiunte inizialmente quantità note di progesterone marcato con trizio onde poter valutare le eventuali perdite che si verificano durante il saggio (recupero). L’estratto etero è stato evaporato sotto flusso di aria a 37 °C e sul residuo secco, ripreso con 0,4 ml di tampone fosfato (0.05M, pH 7.4 contenente 0.1% di BSA), è stato effettuato il dosaggio radioimmunologico. Ad una aliquota di 0,1 ml sono stati

aggiunti 0,1 ml di progesterone triziato (27 pg/tubo) e 0,1 ml di anticorpo diluito 1:10000. La miscela è stata quindi incubata per 18 ore a 4 °C. La separazione dell'ormone legato all'anticorpo da quello libero è stata ottenuta mediante l'aggiunta di 1 ml di una soluzione all'1% di Charcoal e 0,025% di destrano. Dopo incubazione a 4 °C per 15 minuti il Charcoal è stato precipitato mediante centrifugazione a 4000g per 4 min., il surnatante è stato versato in vials da scintillazione e quindi contato in un β -counter Packard modello TRI-CARB 4000.

Parallelamente agli estratti eteri plasmatici, il saggio è stato condotto su quantità note dell'ormone onde allestire una curva di lettura (7-1000 pg/0,1 ml). Il recupero medio è risultato essere dell'84%.

4.3.2 Risultati

I valori medi relativi ai dosaggi del TST, P4, E2 nei due gruppi analizzati (cani esenti da IPB e cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica) sono riportati nella tabella 4.31.

Le concentrazioni di TST variano da un minimo di 0,04 ng/mL ad un massimo di 8,18 ng/mL, quelle del P4 da un minimo di 0,04 ng/mL ad un massimo di 6,69 ng/mL, quelle di E2 da un minimo 1,45 pg/mL di ad un massimo di 22,04 pg/mL. Non è stata verificata alcuna differenza statisticamente significativa nella concentrazione di TST, P4, E2 fra il gruppo di cani esenti da IPB, ed il gruppo di cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica (Student t-test, $P < 0.01$).

Tabella 4.31: Valori medi relativi alla concentrazione di TST (ng/mL), P4 (ng/mL), E2 (pg/mL) nei cani esenti da IPB e nei cani affetti da IPB sintomatica od asintomatica

	TST (ng/mL)	P4 (ng/mL)	E2 (pg/mL)
Cani sani	4.2 ± 1.9 ($n = 32$)	1.6 ± 1.8 ($n = 32$)	9.71 ± 4.9 ($n = 18$)
Cani affetti da IPB	3.5 ± 2.4 ($n = 32$)	0.9 ± 1.3 ($n = 32$)	10.6 ± 5.9 ($n = 20$)

4.3.3 Discussione

L'accrescimento della prostata è modulato dal 5 α -deidrosterone (DHT), metabolita del TST, per azione dell'enzima 5 α -riduttasi. Il DHT tende a concentrarsi all'interno del parenchima prostatico poiché la sua affinità per i recettori prostatici degli androgeni, risulta 2 volte maggiore rispetto al TST e la sua percentuale di dissociazione da essi 5 volte inferiore rispetto al TST (Johnston *et al.*, 2001). L'eziopatogenesi dell'IPB non è ancora del tutto chiarita e diverse ipotesi sono state riportate in merito. Si ritiene che gli androgeni giochino assolutamente un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'IPB, ma che la loro singola azione non sia sufficiente allo sviluppo della patologia. Sembrerebbe infatti che l'IPB abbia origine da un'alterazione nel rapporto fra estrogeni/ androgeni nel parenchima prostatico, dato o da un calo degli androgeni in presenza di stabili livelli di estrogeni, o da un aumento degli estrogeni stessi (Cochran *et al.*, 1981). L'azione degli estrogeni sembrerebbe quella di incrementare il numero dei recettori per gli androgeni, favorendo quindi l'accumulo degli ormoni all'interno del parenchima prostatico; processo all'origine dell'IPB (Trachtenberg *et al.*, 1980).

Il dosaggio ormonale del testosterone sistemico varia entro valori di 1-5 ng/mL (Feldman *et al.*, 1998), di conseguenza i valori riscontrati nel nostro studio sono in linea con quella riportati in letteratura.

Alcuni autori riportano valori di testosterone più bassi da quelli da noi osservati, in particolare di 1.7 ± 0.1 ng/mL nei cani affetti da IPB e di 2.1 ± 0.3 ng/mL nei cani sani, rispetto al valore di 3.5 ± 2.4 ng/mL da noi identificato nei primi e di 4.2 ± 1.9 ng/mL nei secondi (Kawakami *et al.*, 2001). Anche i valori di E2 riportati in entrambi i gruppi di cani, risultano molto maggiori di quelli da noi osservati: 14.8 ± 1.2 pg/mL contro il nostro valore di 9.71 ± 4.9 pg/mL per i cani sani, e $17.3 \pm 0,8$ pg/mL contro al nostro valore di 10.6 ± 5.9 pg/mL per i cani affetti da IPB (Kawakami *et al.*, 2001). Lo studio riportato però esamina un campione di cani numericamente inferiore rispetto al nostro, specialmente per quanto riguarda il gruppo di controllo dei cani sani (solo 5 rispetto ai nostri 32). In tale studio citato inoltre i cani affetti da IPB presentano valori di TST significativamente più bassi rispetto ai cani sani, e valori di E2 significativamente più

elevati rispetto quest'ultimi; supportando l'ipotesi che l'IPB abbia origine da un aumento nei livelli di E2.

I valori di TST ed E2 da noi osservati sono numericamente più vicini a quelli riportati da Brendler (Brendler et al., 1983). Come nel nostro studio, gli autori non hanno riscontrato un aumento dei livelli di E2 nei cani affetti da IPB, ma hanno evidenziato un minimo declino del tasso di TST correlato al graduale aumento dell'età del cane. Nello studio da essi eseguito i gruppi di cani vengono suddivisi in base all'età, nel nostro studio invece i cani vengono suddivisi in base alla presenza o meno di IPB. I valori medi di TST da noi riscontrati nei cani affetti da IPB risultano, seppur non significativamente, lievemente minori a quelli riportati per il gruppo di cani sani, compatibilmente ai valori riportati da Brendler (Brendler *et al.*, 1983). Un altro autore (Shain, 1979) non riporta differenze statisticamente significative nella concentrazione di TST fra cani giovani e cani molto anziani (maggiori agli 11 anni d'età). Nel nostro studio almeno il 50% dei soggetti che rientra nel gruppo dei cani affetti da IPB presenta più di 10 anni d'età, fattore che potrebbe aver influito sull'esito dell'analisi statistica.

Ci riteniamo comunque più in accordo nel ritenere che l'IPB possa avere origine da un'alterata sensibilità della prostata agli androgeni e al declino del rapporto androgeni/estrogeni plasmatici (Brendler *et al.*, 1983; Winter *et al.*, 1995).

BIBLIOGRAFIA

- **Adaramoye A., Akinloye O., Alantunji I. K.:** Trace elements and vitamin E status in Nigerian patients with prostate cancer. *African Health Science* 10 (1): 2-8; 2010.
- **Ali H., Baig M., Rana M. F. et al.:** Relationship of serum and seminal plasma zinc level and serum testosterone in oligospermic and azoospermic infertile men. *J Coll Physicians Surg Pak*, 15 (11): 671-3; 2005.
- **Ambrosio R., Piantedosi D., De Luna R. et al.:** Valutazione ecografica del volume prostatico nel cane sano in relazione all'età. *Veterinaria*, 12 (3): 13-17; 1998.
- **Atalan G., Holt P. E., Barr F. J. et al.:** Ultrasonographic estimation of prostatic size in canine cadavers. *Research in Veterinary Science*, 67: 7-15; 1999.
- **Aughey E.:** Zinc in the cat prostate. *J Reprod Fert*, 22: 65-68; 1970.
- **Barone R.:** Ghiandole annesse all'uretra-prostata. In: *Anatomia comparata dei mammiferi domestici, Edagricole*, vol.4, pp. 156-159; 1994.
- **Barsanti J. A., Finco D. R.:** Evaluation of techniques for diagnosis of canine prostatic diseases. *JAVMA*, 185 (15): 198-200; 1984.
- **Barsanti J. A., Caudle A. B., Crowell W. A. et al.:** Effect of induced prostatic infection on semen quality in the dog. *Am J Vet Res*, 47 (4): 709-712; 1986.
- **Barsanti J. A., Finco D. R.:** Canine prostatic diseases. In: Ettinger S. F., Feldman E. C., *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Saunders Philadelphia*, (Ed. 4), pp. 1662-1685; 1993.
- **Barsanti J.A., Finco D.R.:** Medical management of canine prostatic hyperplasia. In: Kirk R.W., *Current Veterinary Therapy XII. WB. Saunders*, Philadelphia, pp.1033-1034; 1995.
- **Bartlett D. J.:** Studies on dog semen. II Biochemical characteristics. *J Reprod Fert*, 3: 190-205; 1962.
- **Basinger R.R., Robinette C.L., Spaulding K.A.:** Prostata. In: Slatter D., *Trattato di Chirurgia dei Piccoli Animali, Antonio Delfino Editore*, (Ed. 3) vol.2: pp. 1542-1543; 2003.

- **Bell F. W., Klausner J. S., Hayden D. W. et al.:** Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). *JAVMA*, (11): 1623-1630; 1991.
- **Black G. M., Ling G. V., Nyland T. G. et al.:** Prevalence of prostatic cysts in adult, large-breed dogs. *JAAHA*, 34: 177-80; 1998.
- **Bortolami R., Callegari E., Clavenzani P. et al.:** Fisiologia dell'apparato genitale. In: *Anatomia e Fisiologia degli Animali Domestici, Edagricole*, pp. 351- 353; 2009.
- **Boursnell J. C., Baronos S., Briggs P. A. et al.:** The concentrations of zinc in boar seminal plasma and vesicular secretion in relation to those of nitrogenous substances, citrate, galactose and fructose. *J Reprod Fert*, 29:215-227; 1972.
- **Bradbury C. A., Westropp J. L., Pollard R. E.:** Relationship between prostatomegaly, prostatic mineralization, and cytologic diagnosis. *Vet Radiol Ultrasound*, 50 (2): 167-171; 2009.
- **Brendler C. B., Berry S. J., Ewing L. L. et al.:** Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle: Age-associated changes in serum hormone levels and the morphology and secretory function of the canine prostate. *J Clin Invest*, 71: 1114-1123; 1983.
- **Busoni V.:** Organi pelvici e ovaie. In: *Ecografia addominale del cane e del gatto. Poletto Editore*, pp. 82-86; 2007.
- **Cardozo J. A., Fernández-Juan M., Forcada F. et al.:** Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66: 841-850; 2006.
- **Chapdelaine P., Dubè J. Y., Frenette G. et al.:** Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. *J Androl*, 5:206-210; 1984.
- **Christensen G. S.:** The urogenital system and mammary glands. In: Miller M. E., Christensen G. C., Evans H. E. *Anatomy of the dog. WB Saunders*, Philadelphia, pp.726; 1964.
- **Cochran R. C., Ewing L. L., Niswender G. D.:** Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, and 17 β -estradiol from male beagles with spontaneous or induced benign prostatic hyperplasia. *Invest Urol*, 19:142-147; 1981.

- **Colagar A.H., Marzony E.T., Chaichi M.J.:** Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research*, 29: 82-88; 2009.
- **Cornell K. K., Waters D. J., Cooley D. M. et al.:** Canine prostate carcinoma; clinicopathologic findings in 168 cases. *Am Coll Vet Radiol* 87; 1997.
- **Costello M.:** The male reproductive system. In: O'Brien R., Barr F. *Manual of canine and feline abdominal imaging*, BSAVA, pp. 237-243; 2009.
- **Cotard J. P.:** "Le chien et sa prostate". *Le Point Vétérinaire*, 20 (113) ; 1988.
- **Cunningham J. G., Klein B. G.:** Reproductive physiology of the male. In: *Textbook of Veterinary Physiology*, Saunders, pp. 517-528; 2007.
- **Delmann H. D., Brown E. M.:** Apparacchio genitale maschile. In: *Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria*, Casa Editrice Ambrosiana, pp. 299-309; 1994.
- **Derivaux J.:** Plasma seminale. In: *Riproduzione degli Animali Domestici. Vol 1 Fisiologia*. Pàtron Editore, Bologna. pp. 118-120; 1974.
- **De Souza F.F.:** Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino. Thesis, Botucatu, Brazil: Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, 98 pp-; 2003.
- **De Souza F. F., Barreto C. S., Lopes M.D.:** Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology*, 68:100-106; 2007.
- **De Souza F. F., Martins M. I. M., Lopes M. D.:** Vasectomy effect on canine seminal plasma biochemical components and their correlation with seminal parameters. *Theriogenology*, 66:1621-1625; 2006.
- **De Souza F.F, Martins M. I. M., Fernandes C. E. S.:** Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology*, 66: 1606-1609; 2006.
- **Diquélou A., Razaire O., Gulefi J. F. et al.:** Volume measurement of the canine prostate using ultrasonography determination and usual values. In: WSAVA, BSAVA & FECAVA world congress-synopses, p.242; 1997.
- **Dobson H.:** Reproductive endocrinology and pharmacology. In: Meredith M.J., *Animal Breeding and Infertility*, Blackwell Science, pp.62-66, 1995.
- **Dorfman M., Barsanti M. J.:** Le malattia della prostata nel cane. *Veterinaria*, 12 (4): 59-71; 1998.

- **Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G.:** Pelvi ed apparato riproduttore dei carnivore. In: *Testo di Anatomia Veterinaria, Antonio Delfino Editore*, vol.2, pp 445-446; 2009
- **Dubé J. Y., Frenette G., Chapdelaine P. et al.:** Biochemical characteristics of the proteins secreted by dog prostate, a review. *Exp Biol*, 43: 149-159; 1985.
- **Dubé J. Y., Lazure C., Tremblay R. R.:** Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. *Clinical and investigative medicine*, 9 (1): 51-54; 1986.
- **England G.C., Allen W.E., Middleton D.J.:** An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res Vet Sci*, 49:66-70; 1990.
- **Fedrico M.:** *Manuale-atlante di ecografia veterinaria cane e gatto, Calderini-Edagricole*, pp. 151-157; 2001.
- **Feldman E.C., Nelson R.W.** Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 2nd edition, Saunders; 2002.
- **Frazer G. S., Bucci M.:** SDS-page characterization of the proteins in equine seminal plasma. *Theriogenology*, 46:579-591; 1996.
- **Frenette G., Dubé J. Y., Lacoste D. et al.:** Radioimmunoassay in blood plasma of arginine esterase: the major secretory product of dog prostate. *The Prostate*, 10: 145-152; 1987.
- **Frenette G., Dubé J. Y., Tremblay R. R.:** Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 838: 270-276; 1985.
- **Frenette G., Dubé J. Y., Tremblay R. R.:** Origino of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Archieves of Andrology*, 16: 235-241; 1986.
- **Gaiani R., Nannetti G., Mattioli M.:** La concentrazione dell'androstenedione, del testosterone, del diidrotestosterone nel latte e nel plasma durante la gravidanza nella bovina. *Atti Soc. It. Sci. Vet.*, 33:159; 1979.
- **Ganong W.F.:** *Fisiologia medica*, pp. 394-398; 1987.
- **Gobello C., Castex G., Corrada Y.:** Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: mini-review. *Theriogenology*, 57 (4): 1285-91; 2002.

- **Gobello C., Corrada Y.:** Le patologie prostatiche di origine non infettiva nel cane. *Veterinaria*, 16 (3): 37-43; 2002.
- **Gonzales A., Peters U., Lampe G. W. et al.:** Zinc intake from supplements and diet and prostate cancer. *Nutr Cancer*, 61 (2): 206-215; 2009.
- **Hecht S.:** Male reproductive tract- Prostate. In: Pennick D., D'Anjou M. A. *Small Animal Ultrasonography*, Blackwell, pp. 417-430; 2008.
- **Hill R., Wyse G., Anderson M.:** Il controllo ormonale della riproduzione nei maschi. In: *Fisiologia Animale*. Zanichelli, pp. 482-486; 2004.
- **Hornbuckle W. E., MacCoy D. M., Allan G. S., Gunther R.** Prostatic disease in the dog. *Cornell Vet*, 68 (7): 284-305; 1989.
- **Isaacs J. T.:** Changes in dihydrotestosterone metabolism and the development of benign prostatic hyperplasia in the aging beagle. *J Steroid Biochem*, 18 (6): 749-757; 1983.
- **Isaacs W. B., Shaper J. H.:** Isolation and characterization of the major androgen-dependent glycoprotein of canine prostatic fluid. *J Biological Chemistry*, 258 (10): 6610-6615; 1983.
- **Jaworek A., Boryczko Z., Katkiewicz M. et al.:** Evaluation of various techniques in diagnostic of canine prostatic diseases. *5th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction*. Vienna, 13-15 September p. 41; 2001
- **Jiménez M. F., Vicente J. S., Viudes-de-Castro M. P.:** Seminal plasma composition form ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reprod Dom Anim*, 43 (4): 403-8; 2008.
- **Jobim M. I. M., Oberst E. R., Salbego C. G. et al.:** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61:255-266; 2004.
- **Johnston S.D., Kamolpatana K., Root-Kustritz M.V. et al.:** Prostatic disorders in the dog. *Anim Reprod Sci*, 60-61: 405-415; 2000.
- **Johnston S. D., Kustritz M. V. R., Olson P. N. S.:** Disorders of the canine prostate. In: *Canine and Feline Theriogenology*, WB Saunders, pp. 337-355; 2001.
- **Johnston S. D., Osborne C. A., Lipowitz A. J.:** Characterization of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. In:

Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, 4: 560; 1988.

- **Kamolpatana K., Johnston G.R., Johnston S.D.:** Determination of canine prostatic volume using transabdominal ultrasonography. *Vet Radiol Ultrasound*, 41-1: 73-77; 2000.
- **Kareskoski M., Katila T.:** Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*, 107: 249-256; 2008.
- **Kareskoski A. M., Reilas T., Sankari S. et al.:** Alkaline and acid phosphatase, β -glucuronidase and electrolyte levels in fractionated stallion ejaculates. *Reprod Dom Anim*, 45: 369-374; 2010.
- **Kawakami E., Amemiya E., Namikawa K. et al.:** High plasma estradiol-17 β levels in dogs with benign prostatic hyperplasia and azoospermia. *J Vet Med Sci*, 63 (4): 407-412; 2001.
- **Kealy J. K., McAllister H.:** *Diagnostic Radiology Ultrasonography of the dog and cat 4 ed., Elsevier-Saunders*, pp.149-153; 2005.
- **Killian G. J., Chapman D. A., Rogowski L. A.:** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, 49:1202-1207; 1993.
- **Krawiec D. R.:** Study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981-1986). *JAVMA*, 200: 1119-22; 1992.
- **Kutzler M. A., Solter P. F., Hoffman W. E. et al.:** Characterization and location of alkaline phosphatase in canine seminal plasma and gonadal tissues. *Theriogenology*, 60: 299-306; 2003.
- **Lattimer J. C., Essman S. C.:** The prostate gland. In: Thrall D. E. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology, Saunders*, Ed. 5, pp. 729-738; 2007.
- **LeRoy B. E., Northrup N.:** Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. *Vet J*, 180: 149-162; 2009.
- **Li H., Yu N., Zhang X. Y. et al.:** Spermatozoal protein profiles in male infertility with asthenozoospermia. *Chin Med J*, 123 (20): 2879-82; 2010.
- **Lin Y.C., Chang T.C., Tseng Y.J. et al.:** Seminal plasma zinc level and sperm motion characteristics in infertile samples. *Chang Gung Med J*, 23 (5): 260-6; 2000.

- **Liu R. Z., Gao J. C., Zhang H. G. et al.:** Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters. *J Int Med Res*, 38 (3): 923-8; 2010.
- **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al.:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-75; 1951.
- **Lowseth L. A., Gerlach R. F., Gillett N. A. et al.:** Age-related changes in the prostate and testes of the beagle dog. *Vet Pathol*, 27: 347-353; 1990.
- **Omu A. E., Al-Azemi M. K., Kehinde E. O. et al.:** Indications of the mechanisms involved in improve sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract*, 17: 108-116; 2008.
- **O'Shea J. D.:** Studies on the canine prostate gland. I Factors influencing its size and weight. *J Comp Pathol* 72:321-331; 1962.
- **Pèrez F.:** Metodologia per la raccolta dello sperma. In: *Riproduzione Animale: Inseminazione artificiale e trapianto embrionale*. Piccin, pp. 111-125 ;1994.
- **Markham C. L., Donald S. C.:** The male sex accessory tissues-structure, androgen action, and physiology. In: Knobil E., Neill J.D., *The Physiology of Reproduction 2nd*, Raven Press, New York, pp. 1435-1478; 1994.
- **Massányi P., Trandzik J., Nad P. et al.:** Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlation. *Asian J Androl*, 5 (2): 101-4; 2003.
- **Memon M. A.:** Common causes of male dog infertility. *Theriogenology*, 68 (3): 322-8; 2007.
- **Nylan T. G., Mattoon J. S.:** Ultrasonography of the genital system. In: *Veterinary Diagnostic Ultrasound*, W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 151-158; 1995.
- **Mattoon J. S., Nylan T. G.:** Prostate and testis. In: *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, W. B. Saunders, Philadelphia, Ed. 2, pp. 250-259; 2002.
- **Read R. A., Bryden S.:** Urethral bleeding as a presenting sign of benign prostatic hyperplasia in the dog: a retrospective study (1979-1993). *JAAHA*, 31: 261-267; 1995.
- **Reece W.O.:** Accessory sex glands and semen. In: *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*, Wiley-Blackwell, Ed. 4 : pp. 439-440; 2009.

- **Risbridger G.P., Taylor R.A.:** Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: Knobil E., Neill J.D., *The Physiology of Reproduction 3rd*, pp. 1152-3; 2006.
- **Romagnoli S., Vannozzi I., Mollo A.:** La terapia medica dell'iperplasia prostatica del cane: un compromesso tra la fertilità e salute. *Praxis Vet*, 22 (3): 23; 2006.
- **Rucker R. B., Fascetti A. J., Keen C. L.:** Trace minerals. In: Kaneko J. J., Harvey J. W., Bruss M. L., *Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Elsevier*, pp. 686-690; 2008.
- **Sanada S., Yoshida O.:** Zinc concentration and total amount of zinc in seminal plasma of infertile men with special reference to prostatic secretory function. *Hinyokika Kyo*, 31 (11): 1971-87; 1985.
- **Seren E., Leopold A., Bolelli G.:** Peripheral plasma levels of oestrogens and progesterone during the bovine oestrus cycle. *Arch. Vet. It.*, 25: 1-2; 1974.
- **Setchell B. P., Maddocks S., Brooks D.E.:** Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E., Neill J.D., *The Physiology of Reproduction 2nd*, Raven Press, New York, pp. 1083-1143; 1994.
- **Sherwood L., Klandorf H., Yancey P.:** Fisiologia riproduttiva del maschio dei vertebrati. In: *Fisiologia degli animali, Zanichelli*, pp 719-730; 2005.
- **Shin S. A., Nitchuk W. M.:** Testosterone metabolism by the prostate of the aging canine. *Mech Ageing Dev*, 11 (1): 23-25; 1979.
- **Shu-Fei L., Hua W., Maeder D. et al.:** Profiling of zinc-altered gene expression in human prostate normal vs. cancer cells: a time course study. *J Nutritional Biochemistry*, 20:1000-1012; 2009.
- **Sjaastad Ø. V., Hove K., Sand O.:** Physiology of reproduction in the male. In: *Physiology of Domestic Animals, Scandinavian Veterinary Press*, pp. 627-637; 2004.
- **Smith J.:** Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology*, 70: 375-383; 2008.
- **Stowater J. L., Lamb C. R.:** Ultrasonographic features of paraprostatic cystitis in nine dogs. *Vet radiol*, 30: 232; 1989.
- **Tapiero H., Tew K.D.:** Trace elements in human physiology and pathology: zinc and methallothioneins. *Biomed Pharmacother*, 57 (9): 399-411; 2003.

- **Trachtenberg J., Hicks L. L., Walsh P. C.:** Androgen- and estrogen- receptor content in spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. **J Clin Invest**, 65:1051-1059; 1980.
- **Vallee B. L., Falchuck K. H.:** The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological review*, 73 (1): 80-118; 1993.
- **Waheed A., Hassan M. I., Etten R. L.:** Human seminal proteinase and prostate-specific antigen are the same protein. *J Biosci*, 33 (2): 195-207; 2008.
- **Weaver A. D.:** Fifteen cases of prostatic carcinoma in the dog. *Vet Rec*, 109: 71-75; 1981.
- **Winter M. L., Bosland M. C., Wade D. R. et al.:** Induction of benign prostatic hyperplasia in intact dogs by near-physiological levels of 5 alpha-dihydrotestosterone and 17 beta-estradiol. *Prostate*, 26 (6): 325-333; 1995.
- **Wong W.Y., Flik G., Groenen P. M. W. et al.:** The impact of calcium, magnesium, zinc and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive Toxicology*, 15: 131-136; 2001.
- **Zambelli D., Raccagni R., Cunto M. et al.:** Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, 74: 1396-1402; 2010.