

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Laboratorio di Anatomia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup>Medico Veterinario, Milano

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

## L'INNERVAZIONE PRE- E POSTNATALE DELLE VIE URINARIE DISTALI NELLA SPECIE CANINA: IPOTESI NEUROLOGICHE ALLA BASE DELL'INSTAURARSI DEL RIFLESSO DI MINZIONE INTEGRATO

### SUMMARY

*This study was aimed to characterize the autonomic innervation of adult canine bladder and urethra as well as to depict its development during foetal growth. The pattern of cholinergic and adrenergic innervation of the lower urinary tract in adult dogs have been pointed out in details, but little is known about the nitrenergic and peptidergic components, which might modulate the embranchments of the main innervation. In the dog, no data exist about the development of the innervation during ontogenesis, and reports are only sporadic on this matter in men and rats. Immunohistochemical studies were performed on bladder and urethra from 4 adult dogs of both sexes and 10 foetal specimens, with a crown-rump length from 53 to 155 mm (presumptive 38 days of gestation to term). On deparaffinized sections a panel of antisera was applied, including: PGP 9.5 to describe the general intramural innervation, ChAT and TH for the cholinergic and nor-adrenergic components, NOS1, CGRP, SP, NPY, VIP, SOM, GAL, 5-HT to investigate the possible nitrenergic, peptidergic and aminergic ones.*

*Results obtained on adult bladder and urethra show a rich cholinergic ChAT-positive innervation, a moderate number of adrenergic TH-positive nerves and a small number of nitrenergic nNOS-positive ones. Either bladder or urethra receive, distributed throughout the muscle layers, many nerve fibres containing peptides as: CGRP-, SP-, NPY, VIP. Strong to weak ChAT-, CGRP- SP- and NPY-immunoreactivity was detected in the neuronal bodies of intramural ganglia, in peripheral nerve bundles and around blood vessels all over the low urinary tract. 5-HT-immunoreactive endocrine cells are present in the urethral epithelium. Early foetal organs are only supplied by cholinergic nerve fibres, while at birth some nitrenergic and peptidergic components, represented by scarce NO-, CGRP- and SP-containing fibres, become evident. In conclusion, it can be guessed that sensory mediators such as CGRP and SP increase in post-natal ages while other neuropeptides, as NPY and VIP, appear only after birth, once the urinary reflex consolidates.*

**Key words:** dog lower urinary tracts, ontogenesis, autonomic innervation, immunohistochemistry

### INTRODUZIONE

La minzione è resa possibile da un complesso di riflessi finemente integrati, ai quali partecipano con sinergia sia il sistema nervoso somatico che quello vegetativo.

La componente somatica del sistema nervoso, attraverso il nervo pudendo, interviene nel controllo volontario dell'eliminazione dell'urina e armonizza il processo di continenza; la componente autonoma prende parte al riempimento ed allo svuotamento della vescica. Centri nervosi superiori quali corteccia cerebrale, cervelletto e ponte modulano tale complessa funzione.<sup>(6,19)</sup>

La conoscenza anatomica della distribuzione intramurale dell'innervazione della vescica e dell'uretra del cane è di fondamentale importanza per il clinico, per le implicazioni di tipo diagnostico e terapeutico nelle disfunzioni neurologiche della minzione, come ad esempio la cosiddetta incompetenza del meccanismo motorio uretrale con conseguente incontinenza urinaria.<sup>(13,20)</sup>

Questa patologia, soprattutto nella femmina, è stata associata ad alterazioni ormonali in seguito a castrazione, ma è presente, seppure con frequenza molto inferiore, anche nel maschio.<sup>(1)</sup>

Il Sistema Nervoso Autonomo, nelle sue due componenti antagoniste colinergica ed adrenergica, è responsabile del coordinato svolgersi dell'accumulo di urina durante la fase di riempimento della vescica e della fase di svuotamento quando la vescica ha raggiunto il massimo grado di replezione. Nelle vie urinarie, accanto ai classici mediatori chimici acetilcolina (fibre nervose parasimpatiche) e nor-adrenalina (fibre simpatiche), entrambe le branche antagoniste dell'innervazione autonoma possono utilizzare neuromediatori accessori. Queste molecole di segnalazione, dette "neuropeptidi", presenti nelle terminazioni assoniche del neurone, sono racchiuse in vescicole diverse da quelle dei neurotrasmettitori classici e svolgono, sui neuroni postsinaptici, effetti di lunga durata, da pochi minuti ad alcuni giorni. In altri organi ed apparati, ad esempio nell'apparato digerente, questi neuropeptidi sono tipici co-mediatori colinergici (ad es. VIP) o noradrenergici (ad es. NPY). Essi sono rilasciati con lo scopo di modulare in senso eccitatorio od inibitorio la risposta delle strutture effettrici all'input nervoso, ma potrebbero anche comportarsi da neurotrasmettitori primari in neuroni non-adrenergici non-colinergici. Un'ulteriore componente dell'innervazione dell'apparato urinario, inoltre, potrebbe essere quella nitrergica. L'ossido nitrico è un riconosciuto neurotrasmettitore non-adrenergico non-colinergico, al quale normalmente si attribuisce una funzione essenzialmente di tipo inibitorio sull'attività della muscolatura liscia, sia a livello della vescica che a livello dell'uretra.<sup>(27)</sup>

Tali neurotrasmettitori accessori compaiono probabilmente in momenti diversi dello sviluppo pre- e postata-

le, contribuendo all'instaurarsi del riflesso di minzione integrato tipico della vita postnatale.

L'innervazione intramurale delle vie urinarie distali è stata oggetto di studio in numerosi mammiferi.<sup>(25,27)</sup>

Nel cane adulto, Arrighi et al.<sup>(3)</sup> ne hanno fornito una prima descrizione, potendo localizzare con metodiche istoenzimologiche ed immunoistochimiche le componenti che utilizzano i neuromediatori classici acetilcolina e noradrenalina, nonché la componente nitrergica. Il presente lavoro viene a completare il quadro dell'innervazione intramurale delle vie urinarie distali del cane adulto, con la descrizione delle componenti peptidergica e nitrergica e, per confronto, con quella dell'innervazione della vescica e dell'uretra di feti di cane di entrambi i sessi. L'originalità di questo studio anatomico risiede nell'aver potuto seguire lo sviluppo dell'innervazione degli organi in esame, durante l'ontogenesi, in diverse tappe dello sviluppo fetale in gravidanza. La provenienza del materiale di studio, essenzialmente a seguito di ovarioisterectomie per richieste di interruzioni di gravidanza o per distocie con conseguente morte dei feti, rende ragione della sporcizia e sostanziale saltuarietà dei prelievi.

## MATERIALI E METODI

L'immunoistochimica, tecnica ampiamente utilizzata per l'identificazione e la localizzazione di antigeni e di costituenti cellulari e tissutali in situ, rappresenta l'approccio metodologico impiegato per il presente lavoro. Su sezioni istologiche realizzate a partire da campioni tempestivamente fissati dopo la morte e opportunamente inclusi in paraffina, si effettua una reazione fra un anticorpo primario convenientemente scelto e lo specifico antigene, cioè la sostanza che si vuole localizzare nel tessuto in esame. I siti di reazione vengono poi visualizzati con diaminobenzidina la quale forma un precipitato di colore marrone. Una colorazione di contrasto dei nuclei cellulari ottenuta con emallume di Mayer rende più agevole l'osservazione al microscopio ottico.

I feti (n=10) utilizzati per questa ricerca, di sesso maschile e femminile, provenivano da 6 diverse cucciolate. I prelievi sono stati effettuati a livelli diversi della vescica: apice, corpo, collo e uretra prossimale. Nel caso dei feti maschi le sezioni di uretra comprendevano anche la prostata. Si sono potuti analizzare vari stadi di sviluppo fetale, poiché le dimensioni (occipite-coccige) dei feti variavano da 53 mm (cucciolata razza Rottweiler) a 90-92 mm (cucciolata razza Setter) a 153 mm (cucciolata incrocio Pastore Tedesco). I frammenti

di vescica e uretra di adulto sono stati ottenuti da cani di entrambi i sessi (M=2, F=2) sottoposti ad eutanasia per patologie non riguardanti l'apparato urinario.

Il panel di anticorpi che si è scelto di testare comprende un generico marcatore neuronale (Protein Gene Product 9.5 - PGP9.5), marcatori dell'innervazione colinergica (Choline Acetyltransferase - ChAT), adrenergica (Tyrosine Hydroxylase - TH) e nitrgergica (Nitric Oxide Synthase type I - NOS 1), nonché peptidi notoriamente coinvolti nella neuromodulazione nervosa in organi dell'apparato genitourinario<sup>(4,5)</sup> (Calcitonin Gene-Related Peptide - CGRP; Substance P - SP; Neuropeptide Y - NPY; Vasoactive Intestinal Peptide - VIP; Somatostatina - SOM; Galantina - GAL) e l'amina biogena serotonina (5-idrossitriptamina o 5HT) che, oltre a fungere in altri organi ed apparati, da neuromediatore, è notoriamente presente in cellule di tipo endocrino/paracrino nella vescica e nell'uretra di svariate specie domestiche.<sup>(2)</sup>

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La vescica e l'uretra prossimale sia nella femmina che nel maschio adulto posseggono una ricca innervazione, localizzata in particolare nella tonaca muscolare, con fibre nervose che, distribuendosi in grossi fasci negli spazi connettivali, si portano poi a seguire le cellule muscolari, ed innervano anche la sottomucosa. Nello spazio subsieroso della vescica sono presenti grossi gangli intramurali, caratterizzati da numerosi corpi neuronali e fibre nervose (Fig. 1).

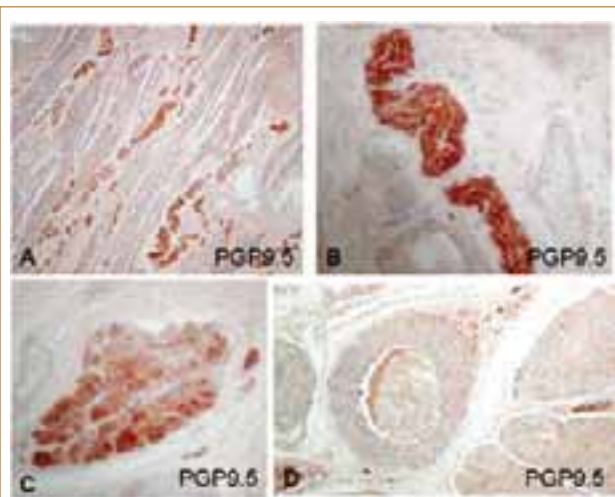


Fig. 1. L'immunoreattività anti-PGP 9.5 consente di evidenziare il disegno generale dell'innervazione della parete di vescica e uretra. In entrambi gli organi, fasci nervosi decorrono nel connettivo (A, ingrandimento 100x; B, ingrandimento 400x). Nello spazio avventiziale sono presenti grossi gangli intramurali (C, ingrandimento 200x). I vasi sanguigni contengono sempre fibre nervose immunoreattive nello spessore della parete muscolare (D, ingrandimento 100x)

Risulta evidente come la principale componente dell'innervazione delle vie urinarie distali sia quella colinergica, visibile sotto forma di grossi fasci nervosi ChAT-immunoreattivi all'interno della tonaca muscolare vescicale e di sottili fibre che giungono fino alla tonaca propria della mucosa di quest'organo; anche i gangli intramurali contengono componenti colinergiche, rappresentate sia da sottili fibre ChAT-immunoreattive che da loro corpi neuronali positivi (Fig. 2 A-D).

Nella parete dell'uretra si riconosce la medesima distribuzione, ma, in particolare, la componente colinergica innerva anche la porzione striata della tonaca muscolare (muscolo uretrale).

L'innervazione di tipo catecolaminergico sembra invece essere più scarsa, nella tonaca muscolare e all'interno delle strutture gangliari (Fig. 2 E-F).

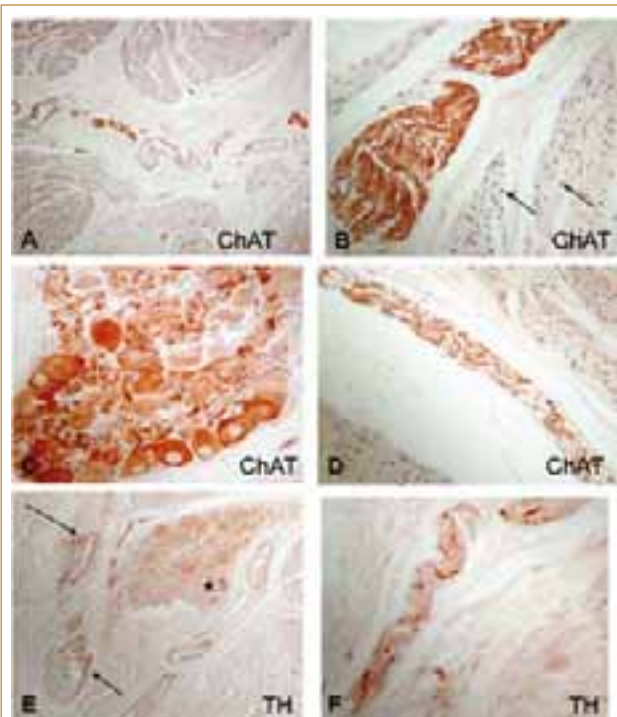


Fig. 2. L'immunoreattività anti-ChAT (A-D) localizza l'enzima colin-acetiltransferasi che interviene nella sintesi dell'acetilcolina, evidenziando l'innervazione colinergica. Nella vescica sono presenti fibre nervose immunoreattive negli spazi connettivali (A, ingrandimento 100x; B, ingrandimento 400x); singole fibre nervose prendono contatto con le cellule muscolari (B, frecce). Nei gangli intramurali i pironofori neuronali e sottili fibre nervose sono intensamente reattivi (C, ingrandimento 400x). Anche nella parete dell'uretra fibre nervose colinergiche decorrono tra gli strati muscolari (D, ingrandimento 400x). L'immunoreattività anti-TH (E-F) evidenzia l'enzima tirosina-idrossilasi che interviene nella sintesi delle catecolamine, perciò dimostra l'innervazione nor-adrenergica. Questa è modicamente presente nella vescica (E, ingrandimento 100x), con fibre nervose immunoreattive, nella tonaca muscolare, nella parete vasale (frecce) e in fibre nervose intragangliari (asterisco). Nell'uretra (F, ingrandimento 100x) sono presenti poche fibre immunoreattive all'interno di fasci nervosi che decorrono nel connettivo tra la muscolatura



La componente nitrergica è poco rappresentata, sia a livello della vescica sia dell'uretra: infatti, solo scarse fibre, sia singole sia in grossi fasci, sono risultate NOS1-immunoreattive a livello della muscolatura e nella tonaca mucosa (Fig. 3 A-B).

Una cospicua innervazione colinergica, adrenergica e nitrergica è stata osservata nei vasi sanguigni degli organi in esame; tale risultato è da mettere in correlazione con la necessità di tali vasi di adattare la loro lunghezza ai diversi momenti fisiologici del riempimento/svuotamento vescicole.<sup>(7)</sup>

Le componenti nervose di tipo peptidergico sono presenti in quantità variabile (Fig. 3 C-L). Grossi fascetti e sottili fibre nervose contenenti il neuromediatore CGRP sono presenti nello strato muscolare vescicale e uretrale, così come in neuroni dei gangli intramurali e in fibre che raggiungono tali gangli e la parete vasale (Fig. 3 C-F). In quantità più scarsa è stata rilevata la sostanza P, a livello di muscolatura vescicale e uretrale e in fibre gangliari (Fig. 3 G). Entrambi i neuropeptidi sono presenti anche nella parete dei vasi sanguigni, il secondo in modo meno evidente. CGRP e SP sono considerati tipici neuromediatrici delle fibre sensoriali e in altre specie, come il ratto, hanno mostrato localizzazioni simili.<sup>(18-28)</sup> I neuropeptidi VIP (Fig. 3 H), e NPY (Fig. 3 I-L), il primo considerato co-mediatore colinergico ed il secondo noradrenergico, sono scarsamente rappresentati all'interno di rare fibre nervose nella tonaca muscolare degli organi in esame e nella compagine della muscolatura vasale. Il NPY è presente anche nei pirenofori delle cellule gangliari, ma sempre in scarsa quantità, ed in alcune cellule dell'epitelio di transizione della vescica, dove svolge presumibilmente attività di tipo neuroendocrino (Fig. 3 M).

La somatostatina è presente solo a livello di muscolatura dell'uretra distale, in rare fibre nervose; nelle vie urinarie del cane adulto, invece, non è stata trovata immunoreattività alla galantina.

L'amina biogena serotonina o 5-HT è stata riscontrata solo all'interno di cellule dell'urotelio della vescica e dell'uretra dove svolge presumibili attività neuroendocrine (Fig. 3 N).<sup>(2)</sup>

Nel considerare i risultati ottenuti nei feti occorre tenere conto delle diverse epoche di sviluppo gestazionale: nei feti più precoci l'innervazione della parete vescicale e di quella uretrale è poco sviluppata, sono presenti, infatti, pochi fasci di fibre nervose di piccole dimensioni nella tonaca muscolare. Perifericamente nella vescica si notano piccoli gangli intramurali. L'innervazione a questo stadio sembra essere unicamente di tipo colinergico (Fig. 4 A). Sono, infatti, assenti gli

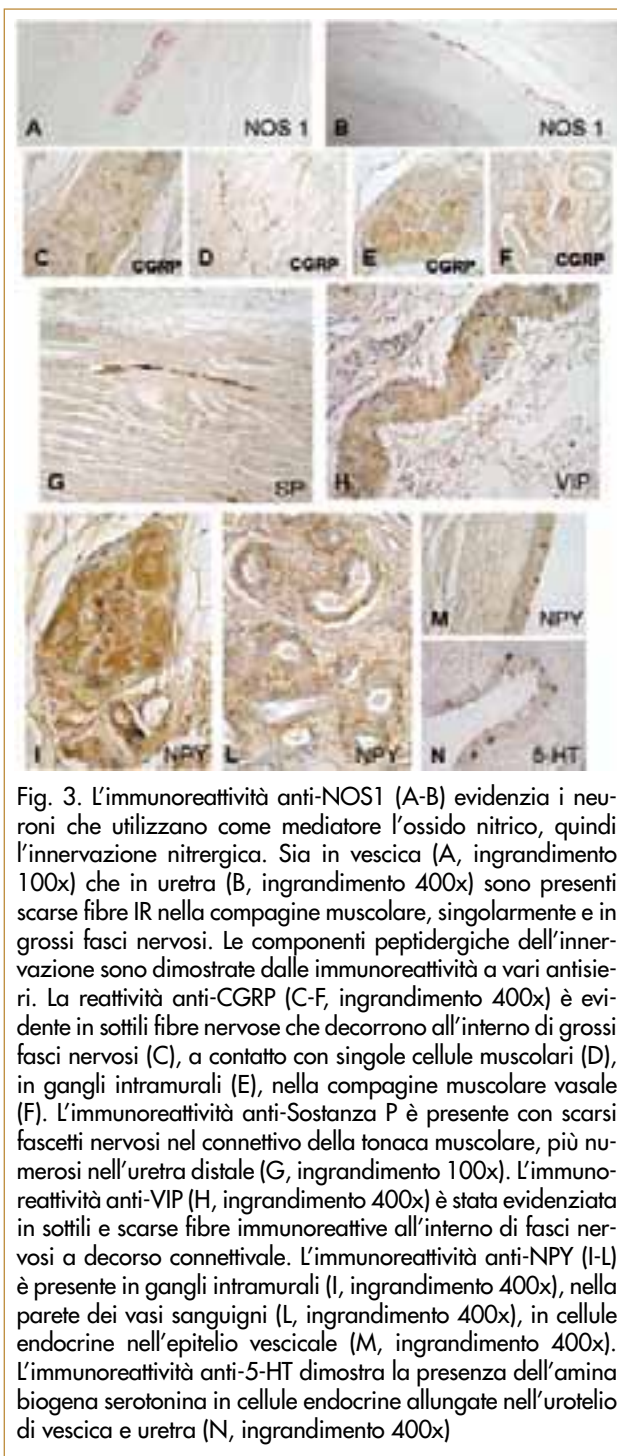


Fig. 3. L'immunoreattività anti-NOS1 (A-B) evidenzia i neuroni che utilizzano come mediatore l'ossido nitrico, quindi l'innervazione nitrergica. Sia in vescica (A, ingrandimento 100x) che in uretra (B, ingrandimento 400x) sono presenti scarse fibre IR nella compagine muscolare, singolarmente e in grossi fasci nervosi. Le componenti peptidergiche dell'innervazione sono dimostrate dalle immunoreattività a vari antisieri. La reattività anti-CGRP (C-F, ingrandimento 400x) è evidente in sottili fibre nervose che decorrono all'interno di grossi fasci nervosi (C), a contatto con singole cellule muscolari (D), in gangli intramurali (E), nella compagine muscolare vasale (F). L'immunoreattività anti-Sostanza P è presente con scarsi fascetti nervosi nel connettivo della tonaca muscolare, più numerosi nell'uretra distale (G, ingrandimento 100x). L'immunoreattività anti-VIP (H, ingrandimento 400x) è stata evidenziata in sottili e scarse fibre immunoreattive all'interno di fasci nervosi a decorso connettivale. L'immunoreattività anti-NPY (I-L) è presente in gangli intramurali (I, ingrandimento 400x), nella parete dei vasi sanguigni (L, ingrandimento 400x), in cellule endocrine nell'epitelio vescicale (M, ingrandimento 400x). L'immunoreattività anti-5-HT dimostra la presenza dell'amina biogena serotonina in cellule endocrine allungate nell'urotelio di vescica e uretra (N, ingrandimento 400x)

altri neuromodulatori testati, ad eccezione della serotonina, la quale è già presente in rare cellule neuroendocrine dell'urotelio di rivestimento delle vie urinarie distali (Fig. 4 B).

Nei feti a termine l'innervazione è presente negli organi in esame in grossi fasci nervosi che decorrono perifericamente, in fascetti di più piccole dimensioni nel connettivo della tonaca muscolare, nei gangli intramurali e a livello della parete dei vasi sanguigni. A questo stadio di sviluppo, l'innervazione colinergica è abbondante e si caratterizza da grossi fasci nervo-

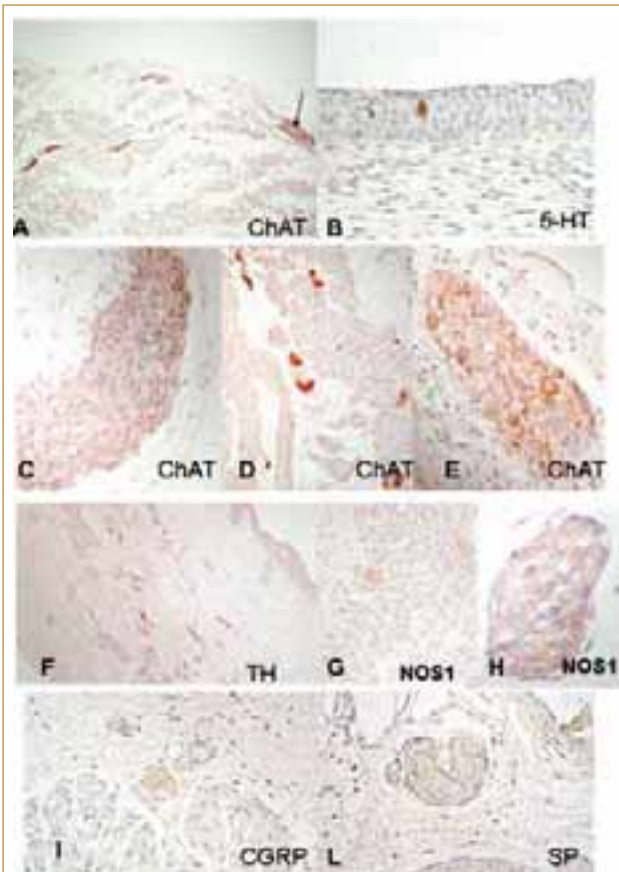


Fig. 4. Nei feti a stadi di sviluppo più precoci (A-B), si nota scarsa presenza di innervazione colinergica (A, ingrandimento 100x), dimostrata da piccoli fasci nervosi ChAT-immunoreattivi nella tonaca muscolare e in piccoli gangli (freccia). L'immunoreattività anti-5-HT dimostra la presenza di cellule endocrine allungate nell'urotelio (B, ingrandimento 400x). Nei feti a termine (C-L) l'innervazione colinergica, dimostrata dalla ChAT-immunoreattività, è presente in grossi fasci nervosi periferici (C, ingrandimento 400x), negli spazi connettivali della tonaca muscolare (D, ingrandimento 100x), in sottili fibre in gangli sottosierosi (E, ingrandimento 400x). L'innervazione nor-adrenergica (F, ingrandimento 100x) e quella nitrenergica (G, ingrandimento 100x; H, ingrandimento 1000x) sono scarsamente rappresentate dalle immunoreattività rispettivamente anti-TH e anti-NOS1, presenti in sottili fibre immunoreattive e in gangli intramurali. L'innervazione peptidergica è rappresentata da scarsissimi fascetti negli spazi connettivali periferici, CGRP- (I, ingrandimento 400x) e SP-immunoreattivi (L, ingrandimento 400x)

si periferici e nel connettivo della tonaca muscolare, da sottili fibre all'interno delle strutture gangliari (Fig. 4 C-E). La componente catecolaminergica dell'innervazione è stata osservata solo in sottili fibre nervose all'interno dell'uretra maschile (Fig. 4 F), così come quella nitrenergica, presente anche in scarse fibre nei gangli intramurali (Fig. 4 G-H). L'innervazione di tipo peptidergico è scarsamente rappresentata e sembra essere costituita solo da rare fibre a decorso periferico, contenenti CGRP (Fig. 4 I) e ancor meno sostanza P (Fig. 4 L); anche nelle strutture gangliari questi neu-

romediatori sono scarsamente presenti. Gli altri neuro-peptidi testati non sono presenti negli organi fetali.

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Riassumendo i dati ottenuti, si può concludere che le varie componenti dell'innervazione delle vie urinarie distali nei feti si sviluppano in modo graduale e compaiono in momenti diversi; alla nascita non hanno ancora raggiunto lo sviluppo completo tipico dell'età adulta.

Nei feti ad uno stadio più precoce di gestazione, l'innervazione è solo abbozzata, essendo scarse le fibre nervose. Sono presenti gangli intramurali nella parete vescicale, contenenti neuroni di piccole dimensioni con citoplasma relativamente scarso. I risultati immunostochimici ottenuti dimostrano la presenza di sola acetilcolinesterasi nelle strutture nervose, con la conseguenza che l'innervazione, a stadi precoci di sviluppo fetale, è unicamente colinergica. È d'altra parte noto il ruolo preminente dell'acetilcolina nelle età prenatali nell'influencare lo sviluppo e la plasticità neuronale.<sup>(12)</sup> È pure interessante a questo proposito notare che nella filogenesi la componente più "antica" dell'innervazione è quella parasimpatica.

Nei feti a termine gli organi sono più fittamente innervati, la componente parasimpatica appare aumentata ed inizia ad essere evidente, solo a livello uretrale, quella ortosimpatica. Confrontando questi dati con quelli dei soggetti adulti si può ipotizzare che, dopo la nascita, l'innervazione ortosimpatica si accresca e vada a raggiungere, oltre all'uretra, anche la vescica, estendendosi con rare fibre anche nei gangli intramurali. Infatti, seppur in maniera esigua, tale componente dell'innervazione è stata riscontrata in queste stesse strutture anche nell'adulto. L'innervazione nitrenergica, poco presente nei feti a termine, sembra doversi sviluppare ancora nel periodo post-natale per raggiungere la distribuzione tipica dell'età adulta, peraltro non abbondante. In lavori precedenti<sup>(3)</sup> è già stato sottolineato come il contingente di fibre nervose nitrengiche, dimostrabile nelle vie urinarie distali di cane adulto, potrebbe avere verosimilmente origine locale, dai corpi neuronali NOS-immunoreattivi osservati nei gangli intramurali. A questo livello potrebbe esercitarsi l'azione inibitoria dell'ossido nitrico sul tono del muscolo uretrale andando ad influenzare direttamente i neuroni colinergici gangliari. Infatti, fibre nitrengiche che accompagnano direttamente la muscolatura vescicale e/o uretrale sono state osservate in numero non elevato nella femmina, mentre nel maschio, più ab-

bondanti, sono state reperite solo a livello prostatico. D'altra parte, circa la possibile co-localizzazione di ossido nitrico e acetilcolina nel tratto urinario distale<sup>(21-24)</sup>, esistono dati, in letteratura, tendenti a dimostrare che l'azione inibitoria dell'innervazione nitrgica sul tono del muscolo uretrale si eserciterebbe direttamente sui neuroni colinergici già a livello dei plessi ipogastrico e pelvico.

La componente peptidergica dell'innervazione delle vie urinarie distali è presente solo nei feti a termine, ed è rappresentata unicamente da scarse fibre contenenti CGRP e sostanza P. La serotonina invece compare in rare cellule neuroendocrine dell'urotelio già in feti precoci, mentre dopo la nascita aumenta, considerando che nell'adulto tali cellule sono più numerose.

Si può quindi dedurre che CGRP e SP, notoriamente neuromediatori presenti in fibre sensoriali, aumentino nello sviluppo post-natale e che gli altri neuropeptidi trovati nel cane adulto, NPY, VIP e somatostatina, compaiano solo dopo la nascita, gradualmente, mentre si consolida nell'individuo il riflesso della minzione. È interessante notare, peraltro, che il riflesso somatico-vescicale ha partenza diversa nel neonato, dove origina dall'atto di leccamento della zona perineale da parte della madre, rispetto all'adulto, dove si instaura a seguito della distensione vescicale e alla stimolazione di recettori di stiramento intramurali. Nel ratto, Maggi et al.<sup>(16,17)</sup> affermano che tale riflesso, originato dalla distensione vescicale e che si riflette in contrazioni ritmiche neurogeniche, è già presente a due settimane di età, mediato da recettori per le tachichinine, sostanza K e sostanza P.

È anche noto che i neurotrasmettitori durante la vita prenatale possono avere una funzione, oltre che nella mediazione della trasmissione dell'impulso nervoso, anche nella morfogenesi del sistema nervoso stesso, segnatamente nel differenziamento e nella crescita neuronale a livello del sistema nervoso centrale<sup>(8)</sup>, nonché, per quanto attiene il CGRP, nella sinaptogenesi.<sup>(11)</sup> È riportato in letteratura che la serotonina è presente in epoche prenatali precocissime, fin dall'uovo fecondato, e che è implicata nella morfogenesi precoce di molte strutture embrionali.<sup>(26)</sup>

Ulteriori studi da eseguirsi in epoche postnatali aiuteranno a delucidare il ruolo dei neuromodulatori nell'instaurarsi del riflesso di minzione. Nel ratto, studi effettuati sulle concentrazioni di peptidi per 18 mesi dopo la nascita<sup>(9,23)</sup> hanno evidenziato una precoce comparsa (prime due settimane di vita) di mediatori sensoriali (CGRP e SP) ed un rapido incremento di NPY, man mano che il riflesso di minzione si consolida-

va, raggiungendo concentrazioni seriche pari a quelle dell'adulto in sole due settimane. NPY andrebbe, infatti, a influenzare l'innervazione colinergica e/o adrenergica. Anche il VIP, con il suo effetto di rilassamento sulla muscolatura liscia della vescica, controllando il rilascio di acetilcolina da parte di fibre colinergiche postgangliari, contribuirebbe alla continenza durante il riempimento vescicale.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il sig. Paolo Stortini per la sua eccellente ed accurata assistenza tecnica.

Questo lavoro è stato finanziato dall'Università degli Studi di Milano (FIRST).

## BIBLIOGRAFIA

1. Aaron A., Eggleton K., Power C., Holt P.E.: Urethral sphincter mechanism incompetence in male dogs: a retrospective analysis of 54 cases. *The Veterinary Record*, 1996, 139, 542-546.
2. Arrighi S., Cremonesi F., Bosi G., Domeneghini C.: Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic Ungulates. *Anatomy, histology, embryology*, 2004a, 33, 1-8.
3. Arrighi S., Cremonesi F., Bosi G., Groppetti D., Pecile A.: Presence of nitrgic innervation in the dog lower urinary tract: morphological basis of urethral competence mechanism. *Archivio Veterinario Italiano*, 2004b, 55, 15-29.
4. Arrighi S., Domeneghini C.: Localization of regulatory peptides in the male urogenital apparatus of domestic Equidae: a comparative immunohistochemical study in *Equus caballus* and *Equus asinus*. *Histology and Histopathology*, 1997, 12, 297-310.
5. Arrighi S., Domeneghini C.: Immunolocalisation of regulatory peptides and 5-HT in bovine male urogenital apparatus. *Histology and Histopathology*, 1998, 13, 1049-1059.
6. Blok B.F., Holstege G.: Two pontine micturition centers in the cat are not interconnected directly: implications for the central organization of micturition. *Journal of Comparative Neurology*, 1999, 403, 209-218.
7. Brading A.F., Greenland J.E., Mills I.W., McMurray G., Symes S.: Blood supply to the bladder during filling. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 1999, 201, 25-31.
8. Cameron H.A., Hazel T.G., McKay R.D.: Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *Journal of Neurobiology*, 1998, 36, 287-306.
9. Ekstrom J., Ekman R., Hakanson R.: Ontogeny of neuropeptides in the rat urinary bladder. *Regulatory Peptides*, 1994, 50, 23-28.
10. Gregory S.P.: Developments in the understanding of the pathophysiology of urethral sphincter mechanism in competence in the bitch. *The British Veterinary Journal*, 1994, 150, 135-150.
11. Herlenius E., Lagercrantz H.: Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Human Development*, 2001, 65, 21-37.
12. Herlenius E., Lagercrantz H.: Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*, 2004, 190, 8-21.
13. Holt P.E., Thrusfield M.V.: Association in bitches between breed, size, neutering



# La più ampia scelta contro le allergie e intolleranze alimentari



**ALIMENTO N°1 con:**  
 - **unica fonte proteica CERVO**  
 - **unica fonte di carboidrati PATATE**

**Exclusion Diet Maintenance Venison & Potato\*** è un alimento completo e bilanciato per cani adulti formulato per la terapia dell'allergia e intolleranza alimentare. La speciale formula Exclusion, utilizza un'unica fonte proteica animale (Cervo) e un'unica fonte di carboidrati (Patate), escludendo alimenti potenzialmente allergenici. Il Cervo e le Patate sono fonti innovative, non comunemente usate nell'alimentazione animale, senza alcun rischio di reazione avversa.



**Cervo** unica fonte proteica animale, altamente digeribile.  
**Patate** unica e preziosa fonte di carboidrati.



**Aloe Vera**, grazie al suo effetto antinfiammatorio e calmante, favorisce la riduzione della sensibilità agli agenti irritanti.



**Estratto di Rosmarino e Vit. E** innovativi conservanti naturali, garantiscono fragranza e freschezza all'alimento.



**β-carotene, Luteina, Taurina, Vit. E e Vit. C** antiossidanti naturali, migliorano le capacità difensive dell'organismo contro i radicali liberi.



**Acidi grassi Omega 6 e Omega 3** in rapporto ottimale (tra 5:1 e 10:1), migliorano le condizioni della cute e del mantello.

**Olio di pesce** fonte molto ricca di acidi grassi poliinsaturi Omega-3 EPA e DHA efficaci nel controllo dei processi infiammatori e allergici della cute.

\*disponibile anche nella versione umido



**Baubon**  
**Exclusion**<sup>®</sup>  
 Dieta monoproteica privativa per cani con allergie e intolleranze alimentari

**Una linea completa di alimenti unici per la fonte proteica impiegata**

Per info: 0426.59140 o [www.baubon.it](http://www.baubon.it)

**L'UNICA GAMMA VACCINALE COMPLETA PRIVA DI ADIUVANTI CHE OFFRE:**

Ceppi di Calicivirus correlati a quelli di campo

Valenza FeLV a vettore virale Canarypox

Chlamydia viva attenuata

Flessibilità di gamma per una protezione personalizzata

PUREVAX® RCP • PUREVAX® RCPFeLV • PUREVAX® RCPChFeLV • PUREVAX® FeLV

**PUREVAX® FA LA DIFFERENZA...E SI VEDE!**

**PUREVAX®**

Il nuovo modo di vedere la vaccinazione felina.

Da Merial. Gli specialisti dei vaccini





- and docking, and acquired urinary incontinence due to incompetence of the urethral sphincter mechanism. *The Veterinary Record*, 1993, 133, 177-180.
14. Lakomy M., Kaleczyc J., Wasowicz K.: Adrenergic innervation of the ureters, urinary bladder, and urethra in pigs. *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch*, 1989, 135, 347-355.
  15. Maggi C.A., Wasowicz K., Kaleczyc J., Chmielewski S.: AChE-positive innervation of the ureters, urinary bladder, and urethra in pigs. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*, 1990, 104, 316-326.
  16. Maggi C.A., Santicoli P., Giuliani S., Regoli D., Meli A.: Activation of micturition reflex by substance P and substance K: indirect evidence for the existence of multiple tachykinin receptors in the rat urinary bladder. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 1986, 238, 259-266.
  17. Maggi C.A., Santicoli P., Meli A.: Postnatal development of micturition reflex in rats. *American Journal of Physiology*, 1986, 250, R926-R931.
  18. Mattiasson A., Ekblad E., Sundler F., Uvelius B.: Origin and distribution of neuropeptide Y-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-containing nerve fibers in the urinary bladder of the rat. *Cell and Tissue Research*, 1985, 239, 141-146.
  19. Nickel R.F., Venker-Van Haagen A.J.: Functional anatomy and neural regulation of the lower urinary tract in female dogs: a review. *The Veterinary Quarterly*, 1999, 21, 83-85.
  20. Nickel R.F., Vink-Notboom M., Van Den Brom W.E.: Clinical and radiographic findings compared with urodynamic findings in neutered female dogs with refractory urinary incontinence. *The Veterinary Record*, 1999, 145, 11-55.
  21. Persson K., Alm P., Johansson K., Larsson B., Andersson K.E.: Co-existence of nitrergic, peptidergic and acetylcholine esterase-positive nerves in the pig lower urinary tract. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 1995, 52/2-3, 225-236.
  22. Persson K., Alm P., Uvelius B., Andersson K.E.: Nitrergic and cholinergic innervation of the rat lower urinary tract after pelvic ganglionectomy. *American Journal of Physiology*, 1998, 274, 389-397.
  23. Sann H., Walb G., Pierau F.K.: Postnatal development of the autonomic and sensory innervation of the musculature in the rat urinary bladder. *Neurosciences Letters*, 1997, 236, 29-32.
  24. Sjostrand N.O., Ehren I., Eldh J., Wiklund N.P.: NADPH-diaphorase in glandular cells and nerves and its relation to acetylcholinesterase-positive nerves in the male reproductive tract of man and guinea-pig. *Urological Research*, 1998, 26, 181-188.
  25. Smet P.J., Jonavicius J., Marshall V.R., De Vente J.: Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience*, 1996, 71, 337-348.
  26. van Kesteren R.E., Spencer G.E.: The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation. *Annual Review of Neuroscience*, 2003, 14, 217-31.
  27. Werkstrom V., Alm P., Persson K., Andersson K.E.: Inhibitory innervation of the guinea-pig urethra; roles of CO, NO and VIP. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 1998, 74, 33-42.
  28. Yokokawa K., Sakanaka M., Shiosaka S., Tohyama M., Shiotani Y., Sonoda T.: Three-dimensional distribution of substance P-like immunoreactivity in the urinary bladder of rat. *Journal of Neural Transmission*, 1985, 63, 209-222.
  29. Yokokawa K., Tohyama M., Shiosaka S., Shiotani Y., Sonoda T., Emson P.C., Hillyard C.V., Girgis S., Macintyre I.: Distribution of calcitonin gene-related peptide-containing fibers in the urinary bladder of the rat and their origin. *Cell and Tissue Research*, 1986, 244, 271-278.

## NORME PER GLI AUTORI

### Struttura degli articoli

Ogni lavoro deve essere redatto secondo il seguente schema:

- Titolo: breve, chiaro, conciso, facilmente classificabile in un indice analitico.
- Summary (circa 10 righe) e Key Words.
- Testo: il testo va scritto senza formattazione.
- Tabelle, grafici, disegni, schemi e fotografie: debbono essere numerati e corredati di didascalia esplicativa.

Impostazione per le didascalie di tabelle/figure:

- Tabella/Grafico/Schema

*Esempio*

Tab.1. + didascalia per esteso che termina senza il punto finale

- Foto/Figura/Disegno

*Esempio*

Fig. 1. + didascalia per esteso che termina senza il punto finale

Le diciture Fig. (Figg. se il riferimento è a più figure) e Tab. (Tabb. se il riferimento è a più tabelle) vanno inserite nel testo al termine del capoverso che ne fa riferimento seguite dal punto finale.

- Bibliografia: la bibliografia deve essere presentata in ordine alfabetico in base al cognome del primo autore, numerata e richiamata nel testo, come qui indicato.<sup>(1)</sup>

La bibliografia va compilata secondo i seguenti esempi:

- Riviste

*Esempio*

1. Bianchi M., Rossi A.: titolo del lavoro. *Rivista per esteso*, 2004, 54, 250 - 255.

- Testi

*Esempio*

1. Verdi G., Rossi A.: titolo del libro. Casa editrice, Milano, 2004, 250 - 255.

- Capitoli di testi

*Esempio*

1. Rossi M., Bianchi L.: nome capitolo. In: autore libro: titolo libro. Casa editrice, Milano, 2004, 250 - 255.

- Atti (proceedings) di congressi

*Esempio*

1. Rossi M.: titolo del lavoro. *Proc (Atti)*, Nome congresso, 2004, 27, 210 - 214.

#### INVIO DEI LAVORI

Il materiale va inviato a:

Dott.ssa Barbara Simonazzi

Dip. Salute Animale Università di Parma

Via del Taglio 8 - 43100 Parma

E mail: barbara.simonazzi@unipr.it