



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA
DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Giovanni Garippa

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXIV CICLO)
(coordinatore: prof. Sergio Ledda)

**INOCULO DI CELLULE STAMINALI SU
TESTICOLO OVINO:
MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA
MEDICO-CHIRURGICA**

Docente Guida

Chiar.mo

Prof. Giovanni Cristoforo Bomboi

Tutor

Dott. ssa Maria Dattena

Direttore

Prof. Giovanni Garippa

Tesi di dottorato del

Dr. Andrea Lai

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE

ABSTRACT	1
INTRODUZIONE	3
<i>ANATOMIA DEL TESTICOLO</i>	6
<i>SVILUPPO PRENATALE</i>	7
<i>DISCESA DEL TESTICOLO</i>	8
<i>FISIOLOGIA DEL TESTICOLO</i>	10
<i>LA BARRIERA EMATO TESTICOLARE</i>	13
<i>DEPLEZIONE DELLA LINEA SEMINALE:STATO DELL'ARTE</i>	14
<i>TRATTAMENTI IRREVERSIBILI DELLA SPERMATOGENESI</i>	15
SCOPO DEL LAVORO	16
MATERIALI E METODI	17
<i>ELIMINAZIONE DELLA LINEA CELLULARE RESIDENTE</i>	17
<i>MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA CHIRURGICA PER ACCEDERE AL MEDIASTINO TESTICOLARE VIA RETE TESTIS EXTRA TESTICOLARE</i>	20
<i>TECNICA CHIRURGICA IN VIVO</i>	21
<i>VALUTAZIONE POST OPERATORIA</i>	23
RISULTATI	25
<i>VALUTAZIONE CIRCONFERENZA SCROTALE</i>	25
<i>CONCENTRAZIONE TESTOSTERONEMIA</i>	26
<i>VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEI TUBULI SEMINIFERI</i>	27
<i>DESCRIZIONE MICROSCOPICA GRUPPO DEI TRATTATI(GRUPPO1)</i>	27
<i>DESCRIZIONE MICROSCOPICA GRUPPO DEI NON TRATTATI(GRUPPO2)</i>	28
<i>DIFFUSIONE DEI COLORANTI NEL TESTICOLO</i>	28
<i>VALUTAZIONE POST OPERATORIA DEL TESTICOLO</i>	29
<i>VALUTAZIONE DEL SEME</i>	29
<i>VALUTAZIONE DELLA FERTILITÀ</i>	29
<i>FLUORESCENZA SEME</i>	30
<i>COLORAZIONE DEL TESTICOLO E SEME CON MYTOTRACKER GREEN</i>	30
DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	31
BIBLIOGRAFIA	36

ABSTRACT

Transplantation of germ line of rams could open new paths in the field of animal reproduction. Until now, researchers have developed techniques very expensive and difficult to apply practically.

The aim of this study is to develop a method that is simple, fast and economically sustainable that allows to perform an inoculum of mesenchymal stem cells in testes of Sarda rams.

In first experiment was tested on rams Sarda the possibility of eliminating the resident germ cell line by the use of a vaccine. The vaccine consists of an analogue of GnRF, that in recent years is used in pig breeding industry to prevent the castration of pigs.

The second trial, however, was to develop a surgical technique that would permit access to the mediastinum testis via extra-testicular testis-rete.

In exp.1, 10 Sarda lambs were divided into 2 groups; group1(n=5) was injected with anti-GnRH Vaccine and group2 (n=5) was the control.

In exp.2, Mitotracker green was injected into the extra-testicular rete testis of 5 Sarda rams and the diffusion of the dye into the testis was evaluated.

The result's showed that the anti-GnRH vaccine inhibited the production of testosterone and reversibly depleted the germ cell line.

.

Also the surgical access to seminiferous tubules into the extra-testicular rete didn't cause testicular damage and the animals resumed normal sexual activity.

INTRODUZIONE

La riproduzione negli animali da reddito da trent'anni a questa parte ha fatto passi da gigante, a partire dalla possibilità di effettuare la fecondazione artificiale per arrivare alla clonazione. Questa branca della biologia è di fondamentale importanza quando si cerca di traslare studi teorici e/o di laboratorio nella pratica clinica.

Imprescindibile risulta essere ormai l'utilizzo della biologia molecolare applicate alle varie tecniche riproduttive. Tuttavia, non sempre delle tecniche molto “fini” di studio e di ricerca possono trovare diretta applicazione nelle realtà zootecniche.

La clonazione della pecora Dolly e di tutte le altre specie, hanno suscitato grandi interessi nella comunità scientifica per le potenziali applicazioni che potranno avere in futuro. Tralasciando fattori di natura etica, il comparto zootecnico (inteso come operatori del settore) si chiede tuttavia quali possano essere i ricavi immediati che il settore può ottenere da tali ricerche.

Soprattutto in realtà come la nostra, dove la zootecnia stenta ancora a decollare, pur essendo il comparto ovino uno dei fattori trainanti l'economia regionale, ci si trova molto di frequente a dover fare un passo indietro per poter dare risposte immediate agli allevatori. Molte aziende zootecniche, sia per ragioni logistiche (difficilmente accessibili), che economiche sono impossibilitate nell'utilizzo delle tecniche più semplici di riproduzione assistita, quali la

fecondazione artificiale e l'embrio transfer. L'allevamento della pecora di razza Sarda necessita imprescindibilmente di un utilizzo molto elevato dei pascoli, rendendo estremamente difficoltosa per l'allevatore qualsiasi tecnica riproduttiva alternativa alla monta naturale. L'ispezione degli animali nelle grosse greggi avviene solo due volte al giorno durante i pochi minuti della mungitura. A causa della crisi economica anche l'esclusivo utilizzo delle spugne intravaginali per la sincronizzazione dei calori rendono antieconomica l'operazione. Anche la ricerca in questo senso sta cercando di dare delle risposte per poter offrire metodi alternativi di riproduzione che ben si possano conciliare con il concetto di zootecnia sostenibile. Si cerca pertanto di intervenire sui riproduttori maschi, per fare in modo che con pochi soggetti si possa trasferire il patrimonio genetico ad una vasta popolazione.

Già da una decina d'anni gli sforzi dei ricercatori sono orientati verso il tentativo di sostituire la linea germinale dei maschi comuni con quella di soggetti di alto valore genetico. Fino ad ora si è

riusciti nell'intento con metodiche molto complesse che prevedono l'inoculo di spermatogoni a livello gonadico dopo aver sterilizzato gli animali mediante chemioterapia o mediante irradiazione. La possibilità di utilizzare staminali da animale adulto non era stata presa in considerazione da nessuno, così pure come l'idea di provare a deprimere la linea cellulare residente con metodi alternativi. Le cellule staminali sono cellule primitive non specializzate dotate della capacità di trasformarsi in altri tipi cellulari attraverso il differenziamento cellulare. La capacità delle cellule staminali di differenziarsi in un tipo cellulare piuttosto che un altro viene influenzata dal microambiente in cui esse si trovano. L'idea di poter utilizzare cellule staminali mesenchimali provenienti da animali di elevato valore genetico per sostituire la linea germinale di animali di basso valore genetico ci ha portato a mettere su questo studio.

Anatomia del testicolo

I testicoli, o gonadi maschili, sono localizzati esternamente all'addome e sono contenuti nello scroto, struttura sacciforme derivata dalla cute e dalle fasce della parete addominale. Ciascun testicolo si trova nel processo vaginale, prolungamento del peritoneo, che attraversa la parete addominale in corrispondenza del canale inguinale. Essi principalmente hanno due funzioni: la produzione di spermatozoi dal momento della pubertà in avanti, e la produzione degli ormoni sessuali maschili, il più importante dei quali è il testosterone. La produzione di quest'ormone influenza la manifestazione dei caratteri sessuali secondari.

Essi si trovano, separati dal rafe mediano, all'interno della borsa scrotale, la quale li riveste mediante vari strati sovrapposti che dall'esterno all'interno sono: cute, sottocute con la tonaca dartos e lo strato sottodartico, la fascia cremasterica (o tonaca spermatica esterna), il muscolo cremastere (o tonaca eritroide), e la tonaca vaginale comune (o tonaca vaginale interna).

Il testicolo è costituito da una tunica albuginea e dalle sue dipendenze, da un parenchima costituito dai tubuli seminiferi, e dallo stroma che circonda i tubuli seminiferi e contenente quest'ultimo le cellule di Leydig a funzione endocrina. La tonaca albuginea è la tonaca più intima del testicolo, costituita da tessuto connettivo fibroso denso con fasci di fibre collagene ad andamento

parallelo; è resistente ed inestensibile, spessa tra 0,1 e 5 mm. Dalla faccia profonda della tonaca albuginea, detta tonaca vascolosa perchè riccamente vascolarizzata, si dipartono dei setti convergenti verso il mediastino testicolare che si approfondano all'interno del testicolo delimitando delle logge. Ciascuna loggia ha forma piramidale, con la base rivolta verso la superficie testicolare e l'apice in corrispondenza del mediastino testicolare (dove passa la rete testis).

Il parenchima di colore rosato, riempie le logge, all'interno delle quali vi è un'organizzazione in lobuli. Ciascun lobulo contiene i tubuli seminiferi contorti, le cui estremità si uniscono a formare i tubuli retti che sboccano nella rete testis, posta nella zona centrale del testicolo, nella zona chiamata mediastino testicolare.

Sviluppo prenatale

I testicoli si sviluppano nella cresta gonadica, disposta medialmente rispetto ai reni embrionali (mesonefro). Le gonadi dell'embrione maschile si differenziano dopo l'arrivo delle cellule germinative primordiali. Queste migrano all'interno della midollare dai cordoni sessuali primari formati dall'epitelio celomatico e forniscono l'elemento dal quale si forma l'epitelio germinale dei tubuli seminiferi. La rete testis si sviluppa come un ammasso separato di cordoni che viene a stabilire da una parte una connessione con i

tubuli del mesonefro (rene) e dall'altra con i futuri tubuli seminiferi; ne risulta che il dotto mesonefrico darà luogo al dotto escretore del testicolo. Nel corso dello sviluppo, nell'ariete la rete viene a disporsi al centro del testicolo. I tubuli del mesonefro, che vanno a collegarsi alla rete testis, formano i piccoli dotti efferenti localizzati nella testa dell'epididimo. La parte rimanente dell'epididimo si forma dal primo tratto del dotto mesonefrico; la porzione del dotto rimanente forma il dotto deferente; un diverticolo terminale invece va a formare la ghiandola vescicolare. Il dotto paramesonefrico, abbozzo del tratto genitale femminile nel maschio degenera.

Due fattori prodotti dal testicolo fetale sono responsabili della differenziazione e dello sviluppo dell'apparato genitale: gli androgeni, prodotti dal testicolo del feto che determinano lo sviluppo del tratto riproduttore maschile e la “sostanza inibente di Muller”! Che è responsabile della regressione dei dotti paramesonefrici (“di Muller”) dai quali, nella femmina, si sviluppano l'utero e la vagina.

Discesa del testicolo

La discesa del testicolo comprende la migrazione addominale fino all'anello inguinale interno, il passaggio lungo il canale inguinale e da ultimo la migrazione all'interno dello scroto. La discesa nello scroto è preceduta dalla formazione del processo vaginale, sacco

peritoneale che si estende verso lo scroto e nel quale è localizzato il legamento inguinale del testicolo che, assieme al legamento diaframmatico ed al mesorchio, funge da apparato di sospensione per il testicolo fetale. Il legamento inguinale collega la gonade al dotto mesonefrico; la porzione più distale viene chiamata gubernaculum testis e termina in corrispondenza della regione in cui è presente lo scroto ancora rudimentale. Prima che la discesa sia ultimata, il gubernaculum si ingrandisce notevolmente, dopo la discesa, regredisce. Si pensa che entrambi questi processi siano importanti nei meccanismi che permettono la discesa dei testicoli.

Dei tre foglietti embrionali le gonadi (sia quelle maschili che quelle femminili), così come la maggior parte delle porzioni dell'apparato riproduttivo, derivano dal mesoderma. L'accrescimento e la differenziazione della gonade, avviene abbastanza rapidamente nella prima parte della vita fetale e riguarda per lo più la sua struttura e le sue connessioni, mentre l'evoluzione successiva risulta più lenta. Le cellule germinative primordiali migrano all'interno della midollare, fornendo l'elemento dal quale si forma l'epitelio germinale dei tubuli seminiferi. La rete testis si sviluppa come un ammasso separato di cordoni. Gli abozzi dei tubuli semiferi permangono non cavitati fino all'epoca della pubertà, così come i gametociti che rimangono poco numerosi fino alla maturità sessuale. Le gonadi maschili iniziano il loro sviluppo nella regione lombare e solo in seguito alla

discesa del testicolo, abbandonano l'addome oltrepassando l'anello inguinale andandosi a sistemare all'interno degli invogli. La discesa dei testicoli è irreversibile e precoce nei ruminanti e quindi nell'ariete, in cui la migrazione è completa molto prima della nascita.

Fisiologia del testicolo

Oltre ad una funzione gametogena (spermatogenesi) i testicoli esplicano anche una funzione endocrina che influisce sulla maggior parte dei caratteri sessuali secondari e sull'attività sessuale.

La spermatogenesi è un processo complesso che prevede vari passaggi, i principali dei quali sono la spermatocitogenesi, la meiosi e la spermiogenesi:

- tutto inizia dagli spermatogoni, che sono cellule germinali diploidi. Tramite il processo chiamato spermatocitogenesi gli spermatogoni si dividono per mitosi dando luogo a cellule gemelle di quelle originarie. Una parte di esse resterà così, in modo da conservare una riserva di cellule germinali, mentre un'altra parte andrà incontro a varie trasformazioni e si trasformerà in spermatociti primari;
- gli spermatociti primari si dividono per meiosi dando luogo a cellule questa volta aploidi chiamate spermatociti secondari. Il passaggio dallo spermatocita primario allo spermatocita secondario

costituisce la prima fase della divisione meiotica;

- gli spermatociti secondari si trasformano a loro volta in spermatidi, chiamati spermatidi rotondi perché sono cellule rotonde col nucleo in mezzo. Il passaggio dallo spermatocita secondario allo spermatide costituisce la seconda fase della divisione meiotica;
- per diventare spermatozoi gli spermatidi rotondi devono subire un processo chiamato spermiogenesi, che comprende varie fasi: prima il nucleo dello spermatide si sposta verso il bordo della cellula, poi lo spermatide si allunga formando così la parte centrale dello spermatozoo, infine il nucleo della cellula si condensa e si forma la coda dello spermatozoo.

Le cellule del Leydig situate fra i tubuli, producono l'ormone maschile, il testosterone. L'epitelio del tubulo è costituito da cellule spermatogeniche e di sostegno o del Sertoli. La membrana basale è provvista di cellule contrattili di tipo mioide. Gli spermatozoi vengono prodotti dalla differenziazione dell'ultima delle numerose generazioni cellulari che derivano dalla divisione degli spermatogoni.

Le due importanti attività funzionali dei testicoli sono controllate dalle gonadotropine secrete dall'ipofisi. L'ormone follicolo-stimolante FSH determina l'inizio dell'attività dei tubuli seminiferi; l'ormone luteinizzante LH modula l'attività endocrina di queste cellule. L'ormone sessuale maschile prodotto dalle cellule interstiziali potenzia l'azione dell'FSH sulla spermatogenesi ed è

responsabile dello sviluppo delle caratteristiche sessuali secondarie, dell'accrescimento e dell'integrità funzionale dell'apparato genitale maschile in toto. Il rilascio delle gonadotropine è regolato da un importantissimo fattore di origine ipotalamica, il GnRH.

L'ormone di liberazione delle gonadotropine (o GnRH), o *ormone di liberazione dell'ormone luteinizzante* (o LHRH) in quanto determina una maggior secrezione di ormone luteinizzante (LH) rispetto all'ormone follicolo-stimolante (FSH), è un neuropeptide di 10 aminoacidi prodotto dai neuroni localizzati nell'ipotalamo medio-basale tra il terzo ventricolo e l'eminenza mediana in contatto con il plesso capillare del circolo portale ipotalamo-ipofisario. Questi capillari consentono che il GnRH sia veicolato nel circolo sistemico senza dover attraversare la barriera ematoencefalica.

Il GnRH rappresenta il principale regolatore stimolatorio della secrezione dell'ormone luteinizzante (LH) e dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) da parte delle cellule gonadotrope ipofisarie. Il GnRH è secreto in maniera pulsatile ad opera di un “generatore ipotalamico di impulso”; questa maniera di secrezione è indispensabile per mantenere una normale funzionalità ipofisaria tant'è che una somministrazione continua di questo ormone conduce a una desensibilizzazione e a una riduzione dei recettori (down-regulation) sulle cellule gonadotrope ipofisarie.

La barriera emato-testicolare

Gli spermatozoi fuoriescono dal testicolo sospesi in un secreto liquido. Questo liquido della rete testis ha una composizione molto differente rispetto a quella del plasma ematico e della linfa. Infatti è presente un importante barriera emato-testicolare che separa l'epitelio seminifero dalla circolazione generale, rendendo il testicolo una zona fortemente immunoprivilegiata. Questa barriera sembra essere costituita da cellule particolari della membrana basale del tubulo e da alcune strutture speciali delle cellule del Sertoli. La barriera permette di separare il testicolo in due compartimenti; in tal modo gli spermatozoi sono separati dagli spermatogoni per la presenza delle cellule del Sertoli. Il punto più debole della barriera sembra trovarsi al livello della rete testis.

Deplezione della linea seminale: stato dell'arte

La deplezione della linea cellulare seminale può essere ottenuta con due metodi: reversibile od irreversibile. Reversibili sono tutti quei metodi che per un periodo più o meno lungo impediscono la spermatogenesi direttamente od indirettamente (ad esempio mediante il blocco della produzione di testosterone).

Un trattamento reversibile della produzione del testosterone già da qualche anno viene utilizzato negli allevamenti industriali dei suini. La legislazione comunitaria infatti impone che la castrazione dei suini maschi allevati a livello industriale possa essere fatta solamente da un veterinario e gli animali debbano essere operati esclusivamente in anestesia generale. Per questioni sia economiche che di benessere animale, la ricerca si è orientata nello sviluppo di un vaccino capace di inibire la produzione del testosterone (Improvac ®). Esso è costituito da un analogo del GnRf (fattore di liberazione delle gonadotropine), e, somministrato con due iniezioni sottocutanee a distanza di un mese una dall'altra determina un'inibizione della produzione di GnRH e quindi di Testosterone, inibendo la spermatogenesi, e di conseguenza lo sgradito “odore di verro” dovuto allo scatolo e all'androstenone, sostanze prodotte dai maschi con la maturazione sessuale che si accumulano nel grasso corporeo.

Trattamenti irreversibili della spermatogenesi

Sia nella clinica che a livello sperimentale, vengono talvolta utilizzati metodi di deplezione della linea seminale irreversibili.

Tra i più utilizzati si ricordano i chemioterapici ed il trattamento con radiazioni ionizzanti.

Tuttavia entrambi oltre a causare una deplezione della linea seminale possono portare grossi danni all'organismo. Il Busulfan, che è uno dei chemioterapici più utilizzati allo scopo ha lo svantaggio di essere specie specifico e spesso le dosi da utilizzare per ottenere la sterilizzazione degli animali può risultare letale.

Le radiazioni ionizzanti appaiono essere leggermente più sicure, in quanto il trattamento è mirato sul testicolo, non interessando l'intero organismo. Tuttavia non è semplice dosare le radiazioni all'uopo. La variabilità nella risposta è spesso molto alta anche all'interno di soggetti della stessa specie. Altro punto a sfavore di questo metodo è l'eccessivo costo del trattamento, sia in termini di strumentazione che di formazione del personale; oltretutto l'utilizzo di certe apparecchiature nella clinica veterinaria può porre indiscutibili problemi di logistica per il trasferimento degli animali.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro è :

la messa a punto di una tecnica medico-chirurgica che consenta di preparare arieti di razza sarda ad un inoculo di cellule staminali nel testicolo

MATERIALI E METODI

Tutte le prove sperimentali sono state condotte presso l' Agris-Dirpa (Dipartimento della Ricerca nelle Produzioni Animali) - Servizio Zootecnico- Settore Scientifico Riproduzione, S.S. 291 Km 18.6 Sassari.

Eliminazione della linea cellulare germinale residente

L'obiettivo di questo esperimento era quello di eliminare dai tubuli seminiferi la linea cellulare germinale residente ed inibire reversibilmente la spermatogenesi.

Per questa prova sono stati utilizzati dieci agnelli di razza sarda di età compresa tra i 6 e gli 8 mesi. Su tutti gli animali è stato prelevato il prelievo dell'emosiero ed è stata misurata la circonferenza scrotale al giorno 0.

Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi: il primo gruppo costituito da 5 animali è stato sottoposto a trattamento vaccinale con 1 ml di un analogo del fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRF) coniugato ad una proteina (peptide sintetico analogo del GnRF coniugato al tossoide difterico) . L'iniezione è stata effettuata in sede sottocutanea, nella regione ascellare, per poter valutare agevolmente eventuali reazioni locali descritte in letteratura sul

maiale. Il secondo gruppo costituito anch'esso da 5 animali, utilizzato come controllo, ha ricevuto un trattamento costituito da 1 ml di soluzione fisiologica inoculato per via sottocutanea sempre nella regione ascellare.

Il prodotto , (Improvac ®), è registrato ed utilizzato da qualche anno sulla specie suina per indurre la produzione di anticorpi anti-GnRF e per produrre una temporanea soppressione immunologica della funzione testicolare. Viene utilizzato nei suini da macello come alternativa alla castrazione fisica per la riduzione del cosiddetto odore di verro causato principalmente dall'androstene e dallo scatolo, sostanze prodotte dai suini maschi interi dopo l'inizio della pubertà.

Dopo 30 giorni gli animali del Gruppo 1 , hanno ricevuto un richiamo vaccinale con 1 ml dello stesso prodotto, mentre gli animali del Gruppo 2 hanno ricevuto una seconda iniezione di soluzione fisiologica.

A partire dal G0, settimanalmente per 12 settimane tutti i dieci animali sono stati sottoposti a prelievo ematico e misurazione della circonferenza scrotale.

I prelievi ematici settimanali sono stati effettuati mediante Vacutainer, con provette prive di additivi. I sieri ottenuti dopo la coagulazione di ciascun campione, sono stati stoccati a -20° in attesa di essere analizzati. Su di essi è stato eseguito alla fine dei 3 mesi un dosaggio della testosteronemia con metodica ELISA,

utilizzando il kit InterMedical.

Dopo 90 giorni due animali di ciascun gruppo sono stati castrati per valutare istologicamente i tubuli seminiferi. Da ciascun testicolo sono stati ottenuti vari campioni, i quali poi sono stati fissati con formalina al 10% ed inclusi in paraffina. Le sezioni istologiche di taglio (5µm), sono state colorate utilizzando una colorazione standard di Ematossilina-Eosina. Le analisi istologiche sono state effettuate al microscopio e le immagini più interessanti sono state fotografate tramite PC con una fotocamera Nikon Ds-fil integrata nel microscopio.

Dopo 7 mesi circa se entrambi i gruppi è stata fatta una valutazione quali quantitativa del seme ed una prova di fertilità. La concentrazione degli spermatozoi è stata misurata mediante spettrofotometro di massa calibrato, mentre la percentuale di motilità di massa è stata analizzata sotto microscopio a contrasto di fase su piano riscaldato a 38°C. Sono stati presi in considerazione solo gli eiaculati che presentavano valore superiore a 3 in una scala che va da 0 a 5 (Evans e Maxwell 1987)

La fertilità degli arieti è stata valutata inoltre facendo accoppiare due arieti di ciascun gruppo con delle pecore precedentemente sincronizzate, ed eseguendo la diagnosi ecografica di gravidanza al 42 giorno mediante ecografia transaddominale con sonda da 3.5 Mhz.

Messa a punto di una tecnica chirurgica per accedere al mediastino via rete testis extra testicolare

In una fase preliminare all'inizio vero e proprio della prova si è proceduto alla raccolta di testicoli di arieti macellati presso mattatoi locali per mettere appunto ex vivo la tecnica chirurgica.

I testicoli degli animali macellati arrivavano presso il laboratorio entro due-tre ore dall'abbattimento, stoccati alla temperatura di 4° ed ancora avvolti dal sacco scrotale e dal resto degli invogli.

Dopo averli liberati dagli invogli scrotali, è stato eseguito un esame ecografico approfondito per mettere in evidenza eventuali anomalie del testicolo.

Solo sui testicoli idonei all'esame ecografico si è proceduto, mediante forbici da dissezione di piccole dimensioni, allo scollamento della testa dell'epididimo dal resto dell'organo, in maniera tale da riuscire a mettere in evidenza la rete testis extra testicolare, che si trova caudo ventralmente ad essa .

Mediante sonda ecografica lineare da 7,5 Mhz, la rete testis extra testicolare è stata incannulata per via ecoguidata con un catetere intravenoso da 24 Ga.

Inizialmente veniva raccordata al catetere una siringa con 1-2 ml di aria, che veniva iniettata per espandere lo spazio virtuale del mediastino testicolare e segnalare ecograficamente il corretto posizionamento del catetere.

Successivamente, sono state inoculate attraverso il catetere dosi diverse (5-10-20 ml), di alcuni coloranti istologici precedentemente filtrati (eosina nigrosina, fucsina basica, trypan bleu). Ciò è stato fatto al fine di valutare la diffusione del colorante attraverso i tubuli seminiferi.

Tecnica chirurgica in vivo

Sono stati utilizzati 5 arieti di razza sarda di età tra gli otto e i dieci mesi circa. Gli animali sono stati selezionati tra un gruppo di coetanei dopo averli sottoposti ad esame obiettivo particolare (EOP) dell'apparato genitale ed esame ecografico dello stesso.

Gli animali sono stati sedati con Acepromazina maleato (Prequillan ®) alla dose di 1mg/kg p.v. Sono stati posizionati in decubito dorsale sul tavolo operatorio e dopo aver preparato la regione scrotale ed inguinale per la chirurgia mediante rasatura, detersione e disinfezione della zona, è stata indotta l'anestesia mediante Tiopentale sodico (Penthotal ®) alla dose di 10mg/kg p.v. Durante tutto l'intervento sono state monitorate la le frequenze cardiaca e respiratoria.

Per ogni testicolo, sulla faccia craniale, è stata eseguita un incisione longitudinale di circa 8-10 cm parallelamente al rafe mediano, a circa 3-4 cm da esso.

Il testicolo è stato estratto dallo scroto ancora avvolto dalla tonaca

vaginale. È stato liberato da essa con un'incisione leggermente più piccola della precedente, e spostata leggermente lateralmente rispetto alla superficie dell'organo.

Esposto il testicolo, si è proceduto allo scollamento della testa dell'epididimo dal resto dell'organo mediante l'utilizzo di forbici da microchirurgia. La testa dell'epididimo è stata scollata e spostata all'indietro fino a mettere in evidenza un sottile “cordoncino” ove si trova la rete testis extra testicolare.

Per via ecoguidata, con l'utilizzo di una sonda linera da 7,5 Mhz si è proceduto all'incannulamento della rete testis extra-testicolare mediante un catetere intravenoso pediatrico della dimensione di 24 Ga. Una volta posizionato, il catetere è stato privato del mandrino ed è stato raccordato ad una siringa sterile da 1 ml nella quale era stata precaricata una piccola dose di aria (0,5ml). Sempre sotto stretto controllo ecografico si è proceduto ad inoculare l'aria della siringa per valutare il corretto posizionamento del catetere. L'allargamento del mediastino testicolare, e la presenza di aria al suo interno, confermati ecograficamente hanno confermato un corretto accesso chirurgico.

Successivamente, 4 ml di colorante Mitotracker Green (Invitrogen) sono stati iniettati molto lentamente attraverso il catetere, in maniera tale da riuscire a raggiungere attraverso i tubuli seminiferi l'intero organo. Il Myto-Tracker Green è una sonda che permette la colorazione elettiva dei mitocondri.

Dopo aver estratto il catetere la testa dell'epididimo è stata rimessa in posizione senza suturarla e l'intero organo è stato rialloggiato all'interno della tonaca vaginale. La tonaca vaginale è stata suturata non senza difficoltà mediante l'apposizione di tre punti di sutura ad U orizzontale alternati, utilizzando del filo riassorbibile di grosso calibro (Vicryl ® USP 0-EP 3,5).

Infine il testicolo è stato riportato all'interno dello scroto che è stato suturato mediante 5 punti semplici staccati. Durante l'esposizione del testicolo, un operatore si è occupato di mantenere ben idratate le superfici mediante irrorazione continua con soluzione fisiologica preriscaldata alla temperatura di 38° circa, onde evitare shock termici e traumatici all'organo.

Dopo l'intervento è stata effettuata una terapia antibiotica a base di Penicillina-Streptomicina (Peni-Strepto 20/20 ®) della durata di 5 giorni ed una terapia antiinfiammatoria mediante iniezioni intramuscolari giornaliere di desametasone acetato (Depodexafon ®) per 5 giorni.

Valutazione post operatoria

Per i 7 giorni seguenti all'intervento è stato effettuato l'Esame Obiettivo Generale dell'animale, valutandone la temperatura corporea, lo stato del sensorio e l'appetito. È stato inoltre fatto giornalmente l'EOP dei testicoli, per valutarne l'eventuale

dolorabilità, ipertermia e mobilità all'interno dello scroto.

A 45 giorni dall'intervento su 3 animali è stata fatta la valutazione della capacità al salto con vagina artificiale e dopo il prelievo di seme è stata fatta la valutazione della qualità dell'eiaculato.

Due settimane dopo l'intervento due animali sono stati castrati per valutare la distribuzione del colorante utilizzato nelle varie parti dell'organo. Il tessuto appena prelevato è stato incluso in un fissativo Optimal Cutting Temperature e successivamente delle sezioni seriali di 5 µm sono state tagliate utilizzando un criostato (Leica, Reichert-Jung, Heidelberg, Germany). Le sezioni sono state montate su vetrini carichi positivamente (Superfrost slides - Fisher Scientific) per ottimizzare le procedure di immunofluorescenza.

Dopo 45 giorni dall'intervento, 3 degli animali trattati erano in grado di eiaculare ed il seme prelevato è stato analizzato per andare a valutare la fluorescenza degli spermatozoi al microscopio confocale (filter-free confocal laser scanning microscope-Leica TCS SP).

Inoltre è stata effettuata la valutazione quali- quantitativa del seme prelevato dagli arieti operati. La percentuale di motilità di massa è stata analizzata sotto microscopio a contrasto di fase su piano riscaldato a 38°C, mentre la concentrazione è stata analizzata usando uno spettrofotometro calibrato. Gli eiaculati utilizzati erano quelli con un valore superiore a 3 in una scala da 0 a 5.

RISULTATI

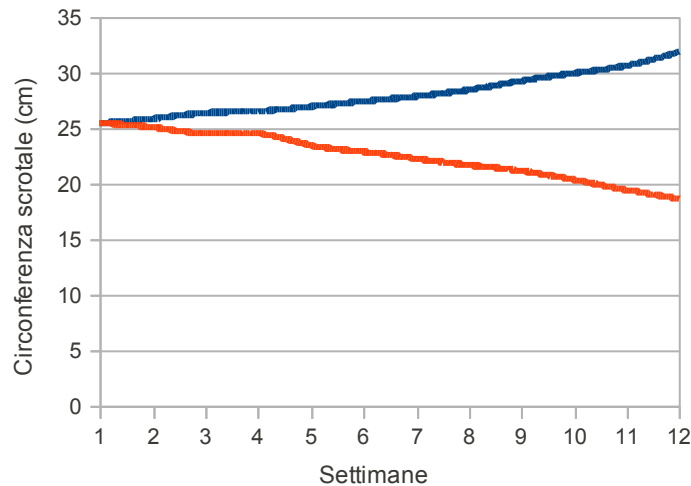
Il vaccino ha determinato nella regione ascellare, a livello del punto di inoculo, una reazione infiammatoria molto violenta. Dopo circa sette giorni dalla somministrazione 4 soggetti su 5 presentavano ipertermia nel punto di inoculo, con gonfiore e dolorabilità alla palpazione. Dopo ulteriori sette giorni in due animali era presente necrosi cutanea della parte interessata, con ulcera ben visibile. È stato necessario sottoporre a terapia giornaliera gli animali mediante la somministrazione di antibiotico per via generale e di una pomata cicatrizzante a livello topico.

Valutazione circonferenza Scrotale

Le circonferenze scrotali, misurate a cadenza settimanale, hanno presentato una lieve e costante diminuzione nel gruppo 1 (trattato con il vaccino anti Gn-RH) in contrasto con l'andamento del gruppo 2 (controllo) che ha continuato nel suo normale accrescimento fisiologico (vedi grafico 1). Nel gruppo 1, le C.S. hanno raggiunto la misura minima a circa metà del trattamento (12a settimana), diminuendo fino a 7 cm di circonferenza scrotale rispetto al valore di partenza, per poi riprendere un costante accrescimento fino a raggiungere una normale circonferenza scrotale di un ariete adulto dopo circa 200 giorni dall'inizio del

trattamento

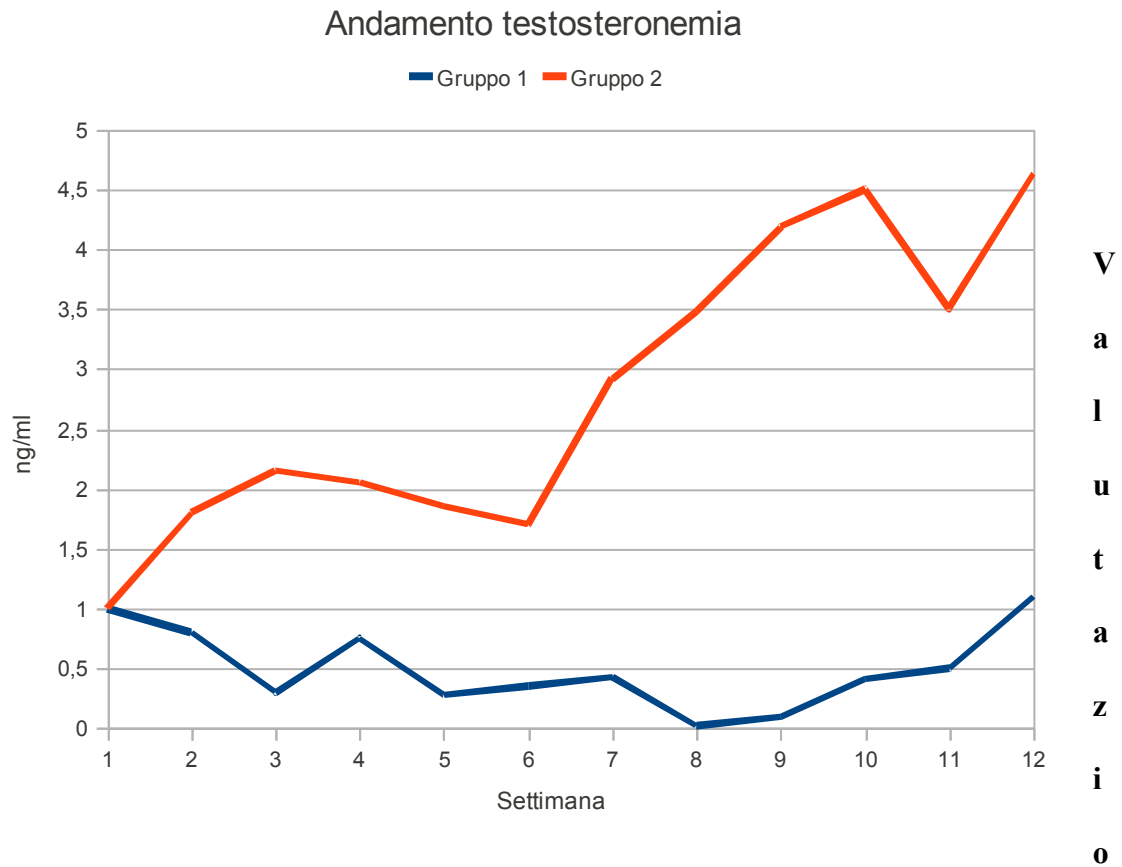
Andamento circonferenza scrotale



C
o
n
c
e
n

trazione testosteronemia

I valori della concentrazione del testosterone totale nel sangue hanno confermato l'andamento delle dimensioni della circonferenza scrotale, diminuendo in maniera costante, fino a raggiungere un valore minimo di 0 alla 9 settimana, e per poi aumentare gradualmente (vedi grafico 2). Diverso è il discorso per quanto riguarda il testosterone libero, che è risultato per tutta la durata dell'esperimento pari a 0 nel gruppo 1 e con valori approssimativi a 1 -2 nel gruppo 2.



ne istologica dei tubuli seminiferi

- **Descrizione microscopica gruppo dei trattati (gruppo1):**

Negli spazi intertubulari si osserva la presenza di lieve congestione vascolare associata ad edema diffuso. Le cellule del Leydig si osservano raramente e mostrano margini indistinti. Diffusa compromissione della linea spermatogenica, con scomparsa da moderata a grave di tutta la linea germinale (spermatogoni e spermatociti) e mantenimento a livello tubulare delle sole cellule

del Sertoli.

- **Descrizione microscopica dei non trattati (gruppo 2)**

I tubuli seminiferi sono costituiti da cellule della linea spermatogenica in diversi stadi di maturazione. Si osserva inoltre la presenza di cellule non spermatogoniche (cellule del Sertoli) negli spazi interstiziali e la presenza di cellule del Leydig disposte all'interno del connettivo intertubulare.

Diffusione dei coloranti nel testicolo

I coloranti utilizzati, sia la Fucsina Basica che l'eosina Nigrosina presentano un'intrinseca viscosità, per questo motivo non sono riusciti a superare completamente la fitta rete lacunare della rete testis intra-testicolare e si sono diffusi solamente nel mediastino e nelle zone immediatamente limitrofe ad esso. Mentre molto più efficace è stato l'utilizzo del Trypan Blue, che si è diffuso uniformemente nel testicolo.

Valutazione post-operatoria del testicolo

Gli animali operati a 48h dall'intervento presentavano un leggero

aumento di volume, da ritenersi normale dopo un intervento comunque abbastanza invasivo. I testicoli erano mobili all'interno dello scroto. Non presentavano ipertermia e da subito hanno ripreso le normali funzioni fisiologiche. A 45 giorni dall'intervento 3 arieti sono stati fatti saltare tramite vagina artificiale, dimostrando il completo recupero della funzionalità testicolare e della attività sessuale attraverso la produzione di un eiaculato normale.

Valutazione del seme

Il seme valutato secondo i criteri standard di volume, concentrazione e motilità, si è rivelato essere mediamente buono.

Valutazione della fertilità

Otto su dieci pecore sono risultate gravide alla diagnosi ecografica di gravidanza (42° giorno) e tutte 8 hanno portato a termine la gravidanza, dimostrando la completa e fisiologica ripresa della spermatogenesi degli arieti vaccinati.

Fluorescenza seme

- **Colorazione di testicolo e seme con Mytotracker-Green**

Andrea Lai. INOCULO DI CELLULE STAMINALI SU TESTICOLO OVINO: MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA MEDICO CHIRURGICA
Tesi di dottorato in Riproduzione, Produzione e Benessere Animale. Università degli Studi di Sassari.

I campioni provenienti dagli animali castrati dopo 15 giorni dall'intervento sono risultati fluorescenti . In essi si riconoscono le strutture caratteristiche del testicolo, quali i tubuli seminiferi, dimostrando la completa distribuzione del colorante.

Tutti i campioni di seme prelevati dopo 45 giorni sono risultati fluorescenti . Gli spermatozoi mostravano una fluorescenza, localizzata esclusivamente nel collo degli spermatozoi, sede elettiva del colorante utilizzato. La fluorescenza è stata riscontrata solo al primo salto dopo l'intervento.

Il seme raccolto è stato valutato secondo i criteri standard di volume, concentrazione e motilità , che si sono rivelati essere mediamente buoni.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Con la pubertà si elevano i livelli delle gonadotropine, ed in particolare nel maschio si ha un aumento dei livelli di testosterone che viene secreto dalle cellule del Leydig, e che risulta fondamentale sia per lo sviluppo testicolare che per il mantenimento della spermatogenesi. I risultati di questo esperimento mostrano che la doppia vaccinazione con un analogo del GnRf, determina un evidente riduzione del volume testicolare, ed una diminuzione della concentrazione ematica del testosterone.

Come evidenziato nei risultati sia la testosteronemia che la circonferenza scrotale diminuiscono gradatamente durante i tre mesi della prova, andando in senso opposto alla tendenza del gruppo di controllo nel quale entrambi i parametri tendono a salire già dalla prima settimana post vaccinazione.

In letteratura si è potuto verificare che studi effettuati sulla specie suina riportano dati molto simili ai nostri (Xian et al., 2002; Zamaratskaia et al., 2008; Einarsson et al., 2009; 2011).

Da tenere in considerazione la reazione infiammatoria violenta che si è avuta nel punto di inoculo in alcuni animali. In futuro probabilmente bisognerà prendere in considerazione un dosaggio diverso rispetto a quello utilizzato nel maiale, o più semplicemente la diluizione del vaccino con della soluzione fisiologica in maniera tale che l'antigene venga distribuito su una superficie più ampia e

non provochi la reazione immunitaria solo su un piccolo punto.

Conferme ai dati relativi alla testosteronemia ed alla circonferenza scrotale sono state date dai referti istologici. Negli animali vaccinati è scomparsa quasi completamente la linea seminale, solo qualche raro spermatogonio può essere evidenziato. Oltre a ciò si ha una netta diminuzione del numero e della dimensione delle cellule del Leydig, le quali sono state poste in stand-by dall'assenza in circolo di gonadotropine. Il gruppo di controllo invece mostra un parenchima testicolare con tutte le linee cellulari presenti, ed anche le cellule di Leydig appaiono in numero maggiore e di maggiori dimensioni rispetto al gruppo dei trattati, a conferma del loro funzionamento testimoniato dai dati sulla testosteronemia. Pertanto questo trattamento risulta una valida alternativa ai trattamenti molto più invasivi utilizzati da altri autori per eliminare le cellule della linea germinale autoctona, quali radiazioni o chemioterapici (Honoramooz et al., 2005; Olejnik et al., 2005). Inoltre permetterebbe di superare dei limiti relativi all'utilizzo di animali impuberi (Rodriguez et al., 2009; Herrid et al., 2006) per lo stesso scopo, quali le dimensioni ridotte dei testicoli ed il preciso raggiungimento della pubertà che può comunque variare.

Per quel che riguarda la messa a punto di una tecnica chirurgica, nonostante si tratti di un intervento chirurgico molto invasivo, con questo studio si è dimostrato che se effettuato in maniera corretta, non si hanno danni irreversibili a carico del sistema riproduttivo

degli animali, i quali ritornano dopo poco tempo ad una normale attività sessuale. Solo nei primi giorni post intervento si è potuto riscontrare un leggero edema a carico dei tessuti scontinuatati per l'intervento. Tuttavia la problematica si è risolta facilmente con l'utilizzo di antinfiammatori somministrati i.m.

I testicoli hanno mantenuto la loro fisiologica mobilità all'interno degli invogli, andando a testimoniare la buona riuscita dell'intervento. Non si sono create aderenze tra i vari strati di rivestimento dell'organo.

Per evitare danni al parenchima testicolare, dopo aver effettuato l'inoculo abbiamo deciso di non ricucire la testa dell'epididimo, ma l'abbiamo semplicemente riposizionata in situ. Ciò è stato fatto considerando che il testicolo era stato esposto scontinuatando la tonaca vaginale molto lateralmente rispetto alla testa dell'epididimo. Di conseguenza la testa si è mantenuta ben aderente al testicolo dopo la sutura della tonaca vaginale.

Fenomeni degenerativi acuti o cronici a carico del testicolo sono accompagnati da essudazione di tipo siero ematico inizialmente e poi purulento. Niente di tutto ciò è stato messo in evidenza.

La scelta della raccolta dell'eiaculato tramite vagina artificiale a 45 giorni dall'intervento, è stata eseguita in relazione al tempo necessario per addestrare gli animali al salto. Ma è probabile che già dopo i 13 giorni necessari agli spermatozoi per attraversare l'epididimo e raggiungere la coda dell'epididimo , avremmo

riscontrato una positività alla fluorescenza. La capacità al salto ed all'eiaculazione indica una completa e fisiologica funzionalità testicolare, che comprende la normale libido dell'animale e la produzione di spermatozoi. I risultati della valutazione del seme, con caratteristiche di volume, concentrazione e motilità nella norma indicano ulteriormente una normale attività sessuale. Normalmente tutte le condizioni patologiche a carico del testicolo, sia congenite che acquisite, determinano invece una riduzione della fertilità, bassa produttività e talvolta sterilità.

La buona distribuzione del colorante nel testicolo, indica che il colorante iniettato dalla rete testis extratesticolare si è distribuito in maniera uniforme a livello dei tubuli seminiferi, così come indicato dai risultati preliminari con l'utilizzo del Trypan Blue. Infatti tutti i campioni analizzati rispettivamente della porzione craniale, mediale e caudale del testicolo sono risultati positivi alla fluorescenza. Similmente dicasi per i risultati ottenuti dalla valutazione della fluorescenza nel seme. Infatti la presenza della fluorescenza negli spermatozoi dell'eiaculato, indica che il colorante ha raggiunto gli spermatozoi maturi presenti nelle diverse sedi (mediastino e tubuli seminiferi). È interessante far notare che la fluorescenza è risultata positiva solo nell'eiaculato ottenuto dal primo salto dopo l'intervento e non in quelli successivi poiché l'animale ha continuato il suo fisiologico ciclo dell'epitelio seminifero.

Si può ragionevolmente ritenere questa una buona base di partenza per l'inoculo di cellule staminali mesenchimali nel testicolo di ariete. Oltretutto le tecniche utilizzate risultano essere molto economiche e facilmente ripetibili. I prossimi studi prenderanno in considerazione la possibilità di eseguire l'intervento direttamente in azienda, solo la parte relativa alla coltivazione delle cellule si svolgerà in laboratorio.

In conclusione nelle nostre condizioni sperimentali, l'accesso ai tubuli seminiferi per via extra testicolare ha dato buoni risultati e fa ben sperare per la prosecuzione dell'esperimento.

BIBLIOGRAFIA

- **Aguggini G, Beghelli V, M.G Clement D'Angelo A., Debenedetti A. , Facello C. ,Giulio L.F. , Guglielmino R. , Lucaroni A. , Maffeo G , Marongiu A. , Naitana S. , Nuvoli P. , Piazza R. (1998) .** *Fisiologia degli animali domestici con elementi di Etologia.* Seconda Edizione . UTET.
- **Barone B.** *Anatomia comparata degli animali domestici .vol 4° Splancnologia Apparecchio uro-genitale, feto e i suoi annessi, peritoneo e topografia addominale. Ed. italiana a cura di Ruggero Bertolami. Edagricole editore.*
- **Brinster RL and Zimmermann JW.** (1994) *Spermatogenesis following male germ cell transplantation. PNAS USA 91: 11298-11302*
- **Brito L.F.C., A.E.D.F. Silva R.T. Barbosa . J.P. Kastelic, (2003).** *Testicular thermoregulation in Bos Indicus, crossbred and Bos Taurus bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. Theriogenology 61: 511-528.*
- **Cui S., Chen Y.F., Yue H.N., He Y.Q, McNeilly A.S, (2003).** *Sexual development and the effects of active immunization against GnRH in Chinese Tanyang ram Lambs. Animal Reproduction Science 77:129-139.*
- **Einarsson S., Andersson K., Wallgren M., Lundström K., RodriguezMartinez H., (2009).** *Short- and long-term effects of immunization against gonadotropin- releasing hormone, using Improvac on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. Theriogenology 71: 302–310.*
- **Einarsson S., C. Brunius , M. Wallgren , K. Lundström ,K. Andersson, G Zamaratskaia, H. Rodriguez-Martinez, (2011) .** *Effects of early vaccination with Improvac on the im developmentand Function of reproductive organs of male pigs.*

Animal Reproduction science 127: 50-55.

- **Evans G, Maxwell WMC, (1987).** *Semen and its characteristics. In: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterwoths, Sidney, pp 22-30 .* □
- **Goyal H.O., Williams C.S., (1987).** *The rete testis of the goat, a morfological study. Acta anat.130 :151-157.* □
- **Grossi C. E., Zaccheo D., Cattaneo L.** *Anatomia Microscopica degli organi dell'uomo (2°vol). UTET*
- **Hafez E.S.E.,** *Biologia e Tecnologia della Riproduzione nelle Specie di Interesse Zootecniche (versione italiana a cura di E. Seren, G. Bono, C. Tamanini – Edizioni Grasso).*
- **Herrid M., S. Vignarajan, R. Davey, I. Dobrinski and JR.Hill, (2006).** *Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. Reproduction 132: 617-624.*
- **Hilbe, M., Jaros, P., Ehrensperger, F., Zlinszky, K., Janett, F., Hässig, M., Thun,R., (2006).** *Histomorphological and immunohistochemical finding in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 148, 599–608.*
- **Hill JR, Dobrinski I. (2006).** *Male germ cell transplantation in livestock.Reprod Fertil Dev; 18:13-8;*
- **Honoramooz A, Megee SO, Dobrinski I. (2002).** *Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod; 66:21-8;*
- **Honoramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. (2003).** *Germ cell transplantation in goats. Mol Reprod Dev;64:422-8.*
- **Honaramooz Ali, E. Behboodi, S.O Megee, S. A Overton, H. Galantino-Homer, Y.**

Echelard, Ina Dobrinski.(2003). Fertility and Germline transmission of donor Haplotype Following Germ Cell Transplantation in Immunocompetent Goats. *Biology of Reproduction* 69 :1260-1264;

- **Honoramooz A., E. Behboodi, C.L. Hausler , S. Blash, S.Ayres , C. Azuma, Y. Echelard and Ina Dobrinsky. (2005).** Depletion of endogenous Germ Cells in Male Pigs and Goats in Preparation for germ cell transplantation *J. Androl* 26: 698- 705;
- **Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J, Lankveld DPK, et al. (2003).** Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*;126:765-74;
- **Jégou B, Le Magueresse B, Pineau C, Sharpe RM. (1991).** Germ cells and post-natal development of testicular function: in vitro studies. *Bull Assoc Anat (Nancy).*;75(228):33-8;
- **Kanatzu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T.Hum. (2005).** Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Reprod.* 20: 2376-2382.
- **Kastelic J.P, R. Byrne Cook and Glenn H. Coulter. (1999).** Effect of Ambient Temperature and scrotal fleece cover on scrotal and testicular temperatures in rams.. *Can J VET Res*; 63: 157-160;
- **Kastelic J.P, R. Byrne Cook and Glenn H. Coulter.** Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams.1996 *Journal of reproduction and fertility* 108 81-85;
- **Lue Y. H , K. Erkilli, P. Y.Liu, K.Ma, C. Wang, A.S. Hikim and R.S. Swerdloff** Fate of bone marrow Stem cells Transplanted into the testis. *The American Journal of Pathology* , vol170 No 3 2007;

- **Lo KC et al. (2004).** “De novo testosterone production in luteinizing hormone receptor knockout mice after transplantation of Leydig stem cell”. *Endocrinology* 145:4011-4015
- **Manunta, G , Floris, B. e Cappai, P. 1981.** Attività circannuale delle gonadi nell'ariete di razza Sarda.. *Arch. Vet. Ital.* 3J2, 117-123.
- **Mieusset R. Bujan L. Mondinat C. Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H., (1987).** Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil. Steril* 48 :1006-11;
- **Moule GR and GM.H. Waites., (1963).** Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum *Reprod. Fertil.* 5: 433-446;
- **Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL., (1999).** Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Reprod*; 60:1429–36;
- **Oatley JM, Tibary A, De Avila DM, Wheaton JE, McLean DJ, Reeves JJ. (2010).** Changes in spermatogenesis and endocrine function in the ram testis due to irradiation and active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *Animal Growth, physiology and reproduction*;
- **Olejník J.A., M. Herrid, R. Davey, K. Hutton, G. Hinch and J. Hill., (2005).** The Successful use of busulfan to deplete endogenous spermatogonia in ram testes. *Reproduction, fertility and development* , 17 :107-107;
- **Parreira GG, Ogawa T, Avarbock MR, Francis LR, Brinster RL, Russell LD., (1998).** Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod*;59:1360–70;
- **Parreira GG, Ogawa T, Avarbock MR, Francis LR, Hausler CL, Brinster RL, et al. (1999).** Development of germcell transplants: morphometric and ultrastructural studies. *Tissue Cell*;31:242–54;

- **Pelletier RM, Byers SW., (1992).** The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech.*;20(1):3-33;
- **Pelletier RM. Prog Histochem Cytochem., (2011).** The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Epub* 46(2):49-127;
- **Rindi-Manni** Fisiologia Umana .UTET;
- **Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Mori C , Dix DJ., (2001).** Effects of Hypertermia on spermatogenesis, apoptosis gene expression and fertility in adult mice. *Biol Reprod* ;65:229-239;
- **Rodriguez-Sosa J.R., H. Dobson, A. Hahnel. (2006).** Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology* 66: 2091-2013;
- **Rodriguez JR, Silvertown JD, Foster RA, Medin JA and Hahnel A. (2009).** Transduction and transplantation of spermatogonio into the testis of ram lambs through the Extra-testicular rete. *Reprod Dom Anim* 44: 612-620 ;
- **Samad H.A., Ali C.S., Ahmed K.M. and Rheman N.U., (1980).** Reproductive diseases of the water buffalo, *Proc.10Th Ind. Cong. Anim. Reprod and A.I.Urbana. Vol IV.XIV* 25-53 ;
- **Senger P.L,** Pathway to pregnancy and parturition second edition 2003;
- **Setchell BP.** (1978). The mammalian testis. Ithaca: Cornell University Press;
- **Setchell BP.** (1998). Heat and Testis. *J Reprod fertil*; 114:179-94;
- **Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL., (2003).** Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biol reprod*, 68:1064-1071;
- **Siddiqui H.U.R ,Ahmad and Khan Z. (2005).** Pathological studies of testes of the ram . *journal of agriculture and social sciences* 1813-2235;

- ***Sofkitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. (2008).*** Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 109(3-5):323-30;
- ***Tuchmann H., Duplessis. (1981).*** Atlante di Embriologia umana. UTET;
- ***Wagers AJ, Weissman IL., (2004).*** Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116:639-48;
- ***Waites GMH. (1970).*** Temperature regulation and the testis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, editors *The Testis* vol. 1 London Academic Press p.241-79;
- ***Xian Y. Zeng , Johan A. Turkstra , Rob H. Melen , Xian Y. Liu ,Fa Q. Chen , Wim M.M. Schaaper , H.B. (Ria) Oonk, Z. Guo, Dick F.M. van de Wiel ., (2002).*** Active immunization against gonadotrophin-releasing hormone in Chinese male pigs: effects of dose on antibody titer, hormone levels and sexual development. *Animal Reproduction Science* 70 :223–233;
- ***Yoon Y., Pitts K., McNiven M., (2002).*** Studying cytoskeletal dynamics in living cells using green fluorescent protein. *Mol. Biotechnol.*, 21, 241-250;
- ***Zamaratskaia Galia *, Lotta Rydhmer, H. Kristina Andersson ,Gang Chen ,Severine Lowagie, Kjell Andersson, Kerstin Lundstrom TM., (2008).*** Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Animal Reproduction Science* 108: 37–48;