



**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 IN: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXIV CICLO)**

(coordinatore: prof. Sergio Ledda)

**INOCULO DI CELLULE STAMINALI  
MESENCHIMALI IN TESTICOLI DI  
ARIETE DI RAZZA SARDA**

**Docente Guida**

**Chiar.mo Prof. Giovanni Bomboi**

**Tutor**

**Dott. ssa Maria Dattena**

**Agris-Sardegna (DIRPA)**

**Direttore**

**Prof. Giovanni Garippa**

**Tesi di dottorato del**

**Dr. Giorgio Meloni**

**ANNO ACCADEMICO 2010 – 2011**

# INDICE

ABSTRACT	VII
RINGRAZIAMENTI	VIII
1. INTRODUZIONE	1
2. PARTE GENERALE	4
2.1 Anatomia del testicolo e dell'epididimo	4
2.1.1 <i>Anatomia macroscopica</i>	4
2.1.2 <i>Anatomia microscopica</i>	11
2.2 Fisiologia ed Endocrinologia del testicolo	13
2.2.1 <i>Pubertà e Spermatogenesi</i>	13
2.2.2 <i>Barriera emato-testicolare</i>	15
2.2.3 <i>Endocrinologia</i>	16
2.3 Tecniche di deplezione della linea germinale	18
2.3.1 <i>Trattamenti reversibili</i>	18
2.3.2 <i>Trattamenti irreversibili</i>	19
2.4 Tecniche chirurgiche di inoculo	20

2.5 Cellule staminali _____	21
2.5.1 <i>Definizione e caratteristiche</i> _____	21
2.5.2 <i>Classificazione</i> _____	22
2.5.3 <i>Origine</i> _____	23
2.5.4 <i>Le cellule staminali mesenchimali (MSC)</i> _____	23
2.5.5 <i>Caratterizzazione delle MSC</i> _____	24
3. SCOPO DEL LAVORO _____	27
4. MATERIALI E METODI _____	28
DISEGNO SPERIMENTALE	
4.1 <b>Primo esperimento: “Messa a punto di una tecnica chirurgica per l’inoculo di cellule nel testicolo”</b> _____	29
4.1.1 <i>Osservazioni e prove preliminari in testicoli “Ex-Vivo”</i> _____	29
4.1.2 <i>Tecnica chirurgica “in vivo”</i> _____	30
4.1.3 <i>Valutazione post-operatoria del testicolo</i> _____	33
4.1.4 <i>Valutazione della distribuzione del colorante nel testicolo</i> _____	33

<b>4.2 Secondo esperimento: “Effetti del vaccino anti-GnRH su arieti di 8 mesi”</b>	<b>34</b>
4.2.1 <i>Scelta degli animali e disegno sperimentale</i>	34
4.2.2 <i>Trattamento con il vaccino Anti-GnRH</i>	34
4.2.3 <i>Prelievi di sangue e misurazione circonferenza scrotale</i>	35
4.2.4 <i>Valutazione testosteronemia</i>	35
4.2.5 <i>Valutazione dell’ epitelio seminifero</i>	35
4.2.6 <i>Valutazione del seme</i>	35
4.2.7 <i>Valutazione della fertilità</i>	36
<b>4.3 Terzo esperimento: “Inoculo di cellule staminali mesenchimali nel testicolo”</b>	<b>37</b>
4.3.1 <i>Preparazione delle cellule</i>	37
4.3.1.1 <i>Isolamento e coltura di cellule staminali mesenchimali ovine da midollo osseo</i>	37
4.3.1.2 <i>Raccolta delle cellule aderenti e conta cellulare</i>	38
4.3.1.3 <i>Caratterizzazione fenotipica della coltura di cellule staminali</i>	38
4.3.1.4 <i>Colorazione delle cellule tramite colorante a fluorescenza PKH26</i>	39

4.3.1.5	<i>Trasduzione delle cellule con vettore retro virale</i>	40
4.3.2	<i>Inoculo cellule staminali mesenchimali “in vivo”</i>	41
4.3.3	<i>Preparazione dei campioni istologici</i>	41
5.	<b>RISULTATI</b>	43
5.1	<b>Primo esperimento: “Messa a punto di una tecnica chirurgica per l’inoculo di cellule nel testicolo”</b>	43
5.1.1	<i>Diffusione dei coloranti nel testicolo</i>	43
5.1.2	<i>Valutazione post-operatoria del testicolo</i>	44
5.1.3	<i>Valutazione del seme</i>	44
5.1.4	<i>Valutazione post-operatoria della distribuzione del colorante nel testicolo</i>	45
5.2	<b>Secondo esperimento: “Effetti del vaccino anti-GnRH su arieti di 8 mesi”</b>	46
5.2.1	<i>Valutazione circonferenza scrotale</i>	46
5.2.2	<i>Valutazione concentrazione testosteronemia</i>	47
5.2.3	<i>Valutazione istologica dei tubuli seminiferi</i>	48
5.2.4	<i>Valutazione del seme</i>	49

5.2.5 <i>Valutazione della fertilità</i>	49
<b>5.3 Terzo esperimento: “Inoculo di cellule staminali mesenchimali nel testicolo”</b>	<b>50</b>
5.3.1 <i>Caratterizzazione MSC</i>	50
5.3.2 <i>Valutazione distribuzione delle cellule mediante immunofluorescenza</i>	51
5.3.3 <i>Descrizione macroscopica dei testicoli</i>	52
5.3.4 <i>Descrizione microscopica dei testicoli</i>	53
<b>6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>56</b>
<b>6.1 Primo esperimento: “Messa a punto di una tecnica chirurgica per l’inoculo di cellule nel testicolo”</b>	<b>56</b>
<b>6.2 Secondo esperimento: “Effetti del vaccino anti-GnRH su arieti di 8 mesi”</b>	<b>58</b>
<b>6.3 Terzo esperimento: “Inoculo di cellule staminali mesenchimali nel testicolo”</b>	<b>59</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>63</b>

## ABSTRACT

Transplantation of stem cells into the testis of recipient males leads to establishment of donor-derived spermatogenesis. This system provides a model for the study of spermatogenesis, manipulation of stem cell sources and evaluation of their potential capability to evolve into a germinal line. The aim of this study was to develop a surgical technique for cell transplantation into ram testis(Exp.1); to test a method to deplete endogenous germ cells(Exp.2); to inject Mesenchimal Stem Cells (MSC) into ram testis and test their capability to diffuse and colonise the epithelium of seminiferous tubules(Exp.3).

In exp.1, 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. In exp.2, 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.3: MSC were injected into the testis of 2 rams. The animals were then castrated after 7 (n=1) and 21 (n=1) days after injection and the diffusion and potential colonisation of MSC was histologically evaluated. The results showed that the surgical access to seminiferous tubules into the extra-testicular rete didn't cause testicular damage and the animals resumed normal sexual activity. The anti-GnRH vaccine inhibited the production of testosterone and reversibly depleted the germ cell line. The evaluation of the distribution and colonization of MSC wasn't possible due to ischemic necrosis observed in the injected testes.

## RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va al mio docente guida Prof. **Giovanni Bomboi** ed al mio Tutor, la dott.ssa **Maria Dattena**, per la loro disponibilità e per i preziosi insegnamenti durante i tre anni di dottorato che mi hanno permesso di crescere sia professionalmente che umanamente.

Ringrazio il Dipartimento di Biologia Animale ed in particolar modo Prof. **Vittorio Farina** per avermi permesso di utilizzare degli strumenti indispensabili per il mio lavoro.

Un doveroso grazie va rispettivamente al dott. **Claudio Murgia** per avermi fornito il vettore e tutto il necessario per marcare le cellule, alla dott.ssa **Ilaria Liuzzo** per averle caratterizzate e alla dott.ssa **Sabine Schoemltz** per i preziosi suggerimenti .

Ringrazio l'istituto di Anatomia Patologica veterinaria per avermi permesso di utilizzare strumenti fondamentali al mio lavoro , ed in particolar modo ringrazio il dott. **Giovanni Burrai** e la dott.ssa **Elisabetta Antuonfermo** per la immensa disponibilità e gentilezza prestatami.

Ringrazio inoltre, tutto il team del Laboratorio di Riproduzione di Agris nelle persone di **Giampiero , Tore ,Antonio e Robertino.**

Ringrazio la dott.ssa **Marilia Gallus** , la dott.ssa **Laura Mara** , la dott.ssa **Susanna Pilichi**, il dott. **Fabrizio Chessa** ed il dott. **Andrea Lai** per il loro aiuto ed i loro consigli.

Un ringraziamento speciale va alla dott.ssa **Laura Falchi** e alla dott.ssa **Daniela Sanna** per essermi state di fondamentale aiuto per la stesura di questa tesi.



# 1. INTRODUZIONE

Le cellule staminali costituiscono per gli organismi viventi superiori una riserva illimitata di cellule pluripotenti, capaci di percorrere qualsiasi processo differenziativo, se stimolate da opportuni segnali. In generale, nell'adulto, la rigenerazione dei tessuti e delle linee cellulari avviene ad opera delle linee cellulari "staminali-residenti". Le cellule "staminali-residenti" dei tessuti adulti proliferano e si differenziano in tipi cellulari maturi corrispondenti al loro tessuto d'origine e non attraversano le barriere tissutali per generare tipi cellulari eterologhi (Weissman, 2000). Tuttavia una letteratura sempre più vasta, sfidando questo postulato, ha dimostrato che cellule staminali isolate da diversi tessuti possono rispondere agli stimoli del microambiente in cui vengono trapiantate e differenziarsi nelle diverse linee cellulari (Wagers et al., 2004; Kucia et al., 2005; Dattena et al., 2009).

Nonostante le limitazioni delle cellule staminali dovute a questioni di natura etica e legislativa, l'utilizzo di queste cellule risulta oramai fondamentale nella medicina rigenerativa, nelle terapie cellulari, nella farmacologia ed in tutte le patologie fortemente invalidanti a carico del sistema cardiocircolatorio, di quello muscolare e nervoso.

La specie ovina, viste le analogie con l'uomo soprattutto per le sue dimensioni, rappresenta un ottimo modello sperimentale per lo studio delle diverse applicazioni di tali cellule, ma potrebbe rivestire un ruolo centrale anche nella zootecnia ed in particolare modo nell'ambito della riproduzione.

In ambito riproduttivo, infatti, l'utilizzo delle cellule staminali potrebbe trovare spazio nella cura di patologie testicolari sia di natura genetica che acquisite, andando a ripristinare le cellule della linea germinale e quindi una normale spermatogenesi in quei soggetti che presentano danni irreversibili. Inoltre si potrebbe sfruttare la pluripotenza

delle cellule staminali, per farle differenziare anche verso altri tipi cellulari testicolari, come le cellule del Leydig e del Sertoli.

Sfruttare le potenzialità delle cellule staminali, potrebbe risultare molto importante anche nel miglioramento genetico. Molte realtà zootecniche infatti, anche in Sardegna, per motivi sia logistici (aziende non facilmente raggiungibili e marginali), sia tecnologici (aziende prive di strutture di ricovero e di contenzione degli animali) che economici, ancora oggi non possono utilizzare le più comuni tecniche di riproduzione assistita, quali la fecondazione artificiale e il trasferimento embrionale. Cambiando la linea germinale di animali con basso valore genetico, con quella di animali con elevato valore genetico si otterrebbero diversi animali, capaci di produrre seme di alto valore genetico, con l'utilizzo esclusivo della monta naturale e verrebbero superate le difficoltà sopra elencate.

Infine potrebbe essere utile per la salvaguardia delle biodiversità, infatti la possibilità di poter produrre animali riproduttori con un patrimonio genetico diverso da quello posseduto alla nascita, permetterebbe di facilitare la salvaguardia di specie a rischio che non possono essere raggiunte dalle più comuni tecnologie di riproduzione quali la Fecondazione artificiale (FA) ed Embryo –Transfer (ET).

I testicoli o gonadi maschili nei mammiferi hanno due funzioni fondamentali: una funzione gametogena (spermatogenesi) ed una endocrina, che influisce sulla maggior parte dei caratteri sessuali secondari e sull'attività sessuale.

A livello dei tubuli seminiferi, sito immuno-privilegiato grazie alla presenza della barriera emato-testicolare, avviene la spermatogenesi. Questo processo porta alla formazione di spermatozoi a partire da spermatogoni. Questi ultimi, sono definiti stem cells per la loro caratteristica di “self –renew” e per la loro capacità di differenziarsi in spermatozoi maturi. È stato dimostrato che spermatogoni isolati da animali donatori e trapiantati in un animale ricevente, reso precedentemente azospermico, sono capaci di

ristabilire una spermatogenesi funzionale (Brinster and Zimmermann ,1994; Brinster et al., 2003; Herrid et al., 2006; Rodriguez-Sosa et al., 2006; Honaramooz et al., 2003; Rodriguez et al.,2009).

La funzione endocrina del testicolo viene espletata dalle cellule del Leydig. Il trapianto di tali cellule in maschi sterili, ha permesso rispettivamente la normale concentrazione ematica di testosterone (Lo et al., 2004) e lo sviluppo di un ambiente favorevole alla ripresa dell' attività riproduttiva (Shinohara et al., 2003; Kanatzu-Shinohara , 2005).

Nell'ultimo decennio, il trapianto di cellule germinali ha permesso la loro colonizzazione su testicoli di animali impuberi (Honoramooz et al., 2002; Honoramooz et al., 2003).

Altri autori hanno isolato e trapiantato spermatogoni su testicoli di arieti adulti, dopo averli resi azospermici, facilitando così la colonizzazione da parte delle nuove cellule (Hill et al., 2006; Izadyar et al., 2003).

Per tanto, visti gli studi correlati, risulta del tutto lecito ipotizzare l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali per i medesimi scopi.

## 2. PARTE GENERALE

### 2.1 Anatomia del testicolo e dell'epididimo

#### 2.1.1 Anatomia macroscopica

I testicoli, o gonadi maschili, fanno parte dell'apparato genitale maschile. Oltre ad una funzione gametogena (spermatogenesi) esplicano anche una funzione endocrina che influisce sulla maggior parte dei caratteri sessuali secondari e sull'attività sessuale.

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.

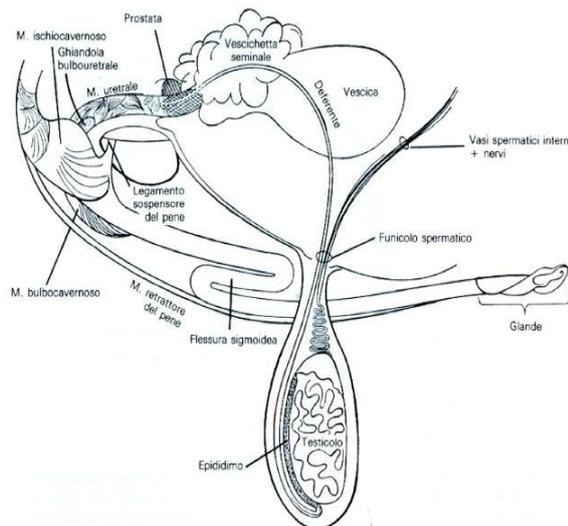


FIG.1 – Apparato riproduttore maschile

Gli *invogli del testicolo* (Tunicae funiculi spermatici et testis) proteggono e sostengono la gonade e le sue prime vie di escrezione quali l'epididimo e l'inizio del dotto deferente ed i suoi vasi.

L'invoglio più superficiale, lo scroto, di natura cutanea è comune ai due testicoli che mantiene da una parte e dall'altra della porzione fissa del pene ed ad una certa distanza dall'anello inguinale.

Contrariamente allo scroto, gli invogli profondi sono propri di ciascun testicolo e si prolungano attorno al suo cordone fino all'anello inguinale profondo.

Lo *scroto* è costituito da due parti sovrapposte : il rivestimento cutaneo propriamente detto ed il dartos. La pelle dello scroto è sottile ed elastica, morbida e strettamente aderente al dartos, con il quale è facilmente spostabile. La pelle dello scroto nell'ariete è parzialmente glabra ed in parte ricoperta da lana, oltre ad essere ricca di ghiandole sebacee che ne rendono la superficie più o meno untuosa. La conformazione esterna della sacca scrotale è molto variabile in relazione al volume ed alla posizione dei testicoli, ma in generale nell'ariete risulta pendula e quasi peduncolare. Presenta una delimitazione che separa i due testicoli e che prende il nome di *rafe dello scroto*.

Il dartos è invece uno strato di tessuto muscolare liscio, frammisto a numerose fibre elastiche che riveste internamente lo scroto e dal quale è impossibile staccarlo senza strapparlo. Questo muscolo forma, attorno a ciascun testicolo ed ai suoi invogli profondi, un sacco completo che ha una funzione di sostegno del testicolo ed un importantissima funzione nel determinare i movimenti vermiformi e le pieghe dello scroto in risposta a degli stimoli esterni.

La *fascia spermatica esterna* è uno strato connettivale che separa lo scroto dagli invogli profondi, consentendo ampi spostamenti del primo sui secondi.

Il *muscolo cremastere* si presenta come una fascia carnosa posta dorso lateralmente al sacco fibroso formato dalla fascia spermatica interna. Questo è un muscolo striato e pertanto ha una contrazione volontaria e rapida, tramite la quale il testicolo viene spinto verso la regione inguinale.

La *fascia spermatica interna* o “tonaca fibrosa del testicolo” è associata al foglietto parietale della tonaca vaginale, di cui rappresenta un vero e proprio sdoppiamento paragonabile alla pleura o al pericardio.

La *tonaca vaginale* è una dipendenza del peritoneo con il quale è in comunicazione a livello dell’anello vaginale e costituisce la tonaca sierosa del testicolo e del suo cordone. Come tutte le sierose, la tonaca vaginale è costituita da due foglietti che delimitano la sua cavità: una lamina parietale ed una viscerale, unite da un meso.

La lamina parietale aderisce alla fascia spermatica interna, riproducendone la forma. La lamina viscerale riveste invece strettamente il testicolo, l’epididimo ed i componenti del cordone spermatico. Il meso che unisce le due lamine prende il nome di *mesorchio*. La vascolarizzazione e l’innervazione di questi invogli, sono completamente indipendenti da quelle del testicolo e del suo cordone.

Il **testicolo** (Testis) rappresenta la gonade maschile. È un organo pari, posizionato assieme all'epididimo all'interno degli invogli testicolari e dello scroto.

- *Caratteri fisici*: il colore bianco bluastrò dipende per lo più dallo spessore dell'albuginea, mentre il parenchima si presenta bruno-grigiastro o giallastro. La consistenza varia col soggetto e con lo stato fisiologico; di solito compatta ed elastica anch'essa comunque dipende dall'albuginea. Anche il peso e le dimensioni dei testicoli sono molto variabili soprattutto in relazione all'età, allo stato fisiologico ma anche alla stagione riproduttiva. Le dimensioni e l'accrescimento del testicolo sono comunque proporzionali alle altre parti del corpo.
- *Conformazione*: Ciascun testicolo, di forma ovoidale, è leggermente compresso da un lato all'altro e nell'ariete risulta abbastanza allungato. Si possono distinguere due facce, una laterale ed una mediale, due margini, uno libero ed uno epididimale ed infine due estremità, una capitata in continuità strutturale con l'epididimo e che riceve il cono vascolare e che nell'ariete risulta posta superiormente ed una caudata che costituisce il polo opposto.
- *Topografia e mezzi di fissità*: il testicolo nell'ariete è situato abbastanza cranialmente, direttamente sotto-inguinale ed assai pendulo tra le cosce. Di solito le due gonadi non sono perfettamente simmetriche, per evitare la compressione durante l'adduzione delle cosce, grazie anche alla grande mobilità all'interno dello scroto,
- *Connessioni con l'epididimo*: la testa dell'epididimo è in continuità strutturale con l'estremità capitata del testicolo, dalla quale riceve i canalicoli efferenti; è unita anche ad opera del peritoneo viscerale e del connettivo sottoperitoneale che si ispessisce sulla faccia laterale formando il legamento della testa dell'epididimo. L'estremità caudata della gonade è unita alla coda dell'epididimo mediante il

legamento proprio del testicolo. Tra le due estremità il corpo dell'epididimo è staccato dal testicolo.

- *Cordone spermatico*: chiamato anche funicolo spermatico, è costituito da due parti parallele ed ineguali: il cono vascolare, formato dalle flessuosità dell'arteria testicolare e dalle vene del plesso pampiniforme ed il dotto deferente che dalla coda dell'epididimo, costeggia parallelamente il testicolo fino all'anello vaginale. Entrambe queste parti sono rivestite dalla tonaca vaginale.
- *Conformazione interna del testicolo*: la gonade maschile presenta la struttura degli organi pieni. L'organo, sezionato trasversalmente, presenta uno *scheletro fibroso*: appare delimitato perifericamente dalla tonaca *albuginea* che posteriormente si ispessisce in una formazione foggata a cuneo che prende il nome di *mediastino*;

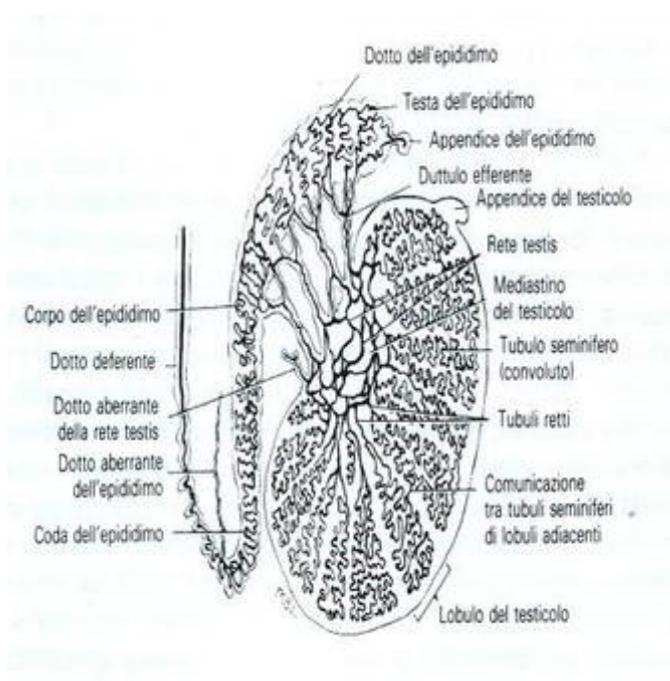


FIG.2 – Testicolo ed epididimo

dal mediastino si distaccano numerosi *setti* che decorrono radialmente fino a raggiungere l'albuginea e che dividono l'organo in *logge*.

Le logge suddividono il testicolo in *lobuli*, che costituiscono il parenchima dell'organo, che a sua volta consiste di 1-6 *tubuli seminiferi contorti* di lunghezza e

diametro variabile. I tubuli contenuti in ciascuna loggia sono avvolti da uno *stroma*, in cui si reperiscono isolotti di cellule mesenchimali ad attività endocrina denominate *cellule del Leydig* o *cellule interstiziali* e che nell'insieme costituiscono la ghiandola interstiziale della gonade maschile. In vicinanza dell'apice di ciascun lobulo, i tubuli seminiferi contorti, assumono un decorso pressoché rettilineo e mutano la loro struttura proseguendosi nei *tubuli retti*. Questi ultimi, che rappresentano il tratto iniziale delle vie spermatiche, penetrano nel mediastino dove si anastomizzano formando la *rete testis* (rete del Haller) dalla quale emergono i condottini efferenti che abbandonano il testicolo per portarsi nella testa dell'epididimo.

La rete testis è accolta nel mediastino e può essere anatomicamente suddivisa in 3 parti: una parte settale (rappresentata dai tubuli retti), una parte mediastinica ed una parte extratesticolare. Tra le tre parti, la più sviluppata è sicuramente quella mediastinica, che occupa 2/3 della lunghezza dell'asse centrale del testicolo dall'estremità capitata a quella caudata. Il lume dei canali della parte mediastinica è molto variabile (range = 10-500µm) ed è spesso attraversata da delle trabecole di lunghezza e larghezza variabili (range = 10-100 µm). Al contrario la rete settale è corta, relativamente rettilinea e connessa con la parte terminale dei tubuli seminiferi tramite la porzione mediastinica della rete. La rete testis extra-testicolare, come dice lo stesso nome, è localizzata al di fuori del testicolo tra l'estremità capitata dello stesso ed il margine ventro-mediale dei canalicoli efferenti. Questa forma una dilatazione simile a un sacco (di circa 2mm di diametro), comunque trabecolata come la porzione mediastinica (Goyal and Williams, 1987). Pertanto la rete testis mette in comunicazione funzionale il testicolo con l'epididimo.

L'*epididimo* è un organo strettamente connesso al testicolo. Dall'estremità capitata della gonade riceve i canalicoli efferenti, mentre dall'estremità opposta si continua

con il dotto deferente. L'epididimo contorna il testicolo e lo deborda con le sue due estremità , che risultano più voluminose. È costituito da una testa , un corpo ed una coda. La testa è allargata e copre più o meno l'estremità capitata del testicolo , alla quale è adesa grazie alla presenza della rete testis extra-testicolare ed alla continuità della sua albuginea con quella della gonade, alla quale risulta attaccata anche mediante una sottile espansione fibrosa (legamento della testa dell'epididimo). Il corpo , stretto e appiattito è libero rispetto al testicolo. La coda risulta distaccata dal testicolo , con il quale non è in continuità strutturale. La struttura dell'epididimo è costituita da un sistema canalicolare che continua la struttura dei canalicoli efferenti del testicolo.

### 2.1.2 Anatomia microscopica

I tubuli seminiferi contorti rappresentano il maggior costituente del parenchima testicolare. Il numero di essi in ciascun testicolo può variare da 200 a 800, ma è comunque in rapporto al volume del testicolo. Iniziano a fondo cieco e lungo il tortuoso cammino dei tubuli si possono creare delle anastomosi. Il diametro dei tubuli varia da 120-300  $\mu\text{m}$ , e presenta un lume a contorni indistinti ed irregolari, fisiologicamente occupato da spermatozoi e residui cellulari.

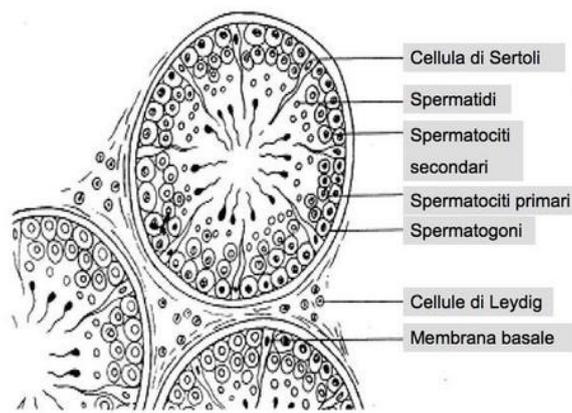


FIG.3 -Tubuli seminiferi

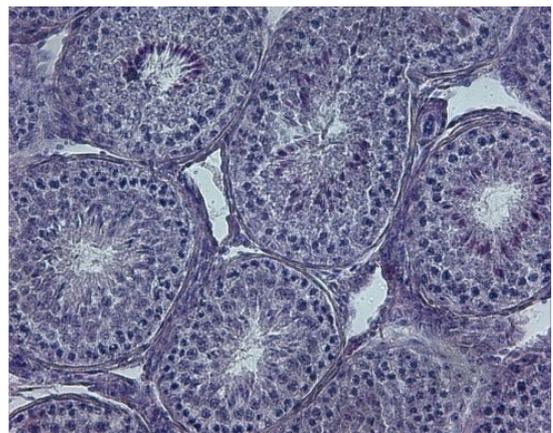


FIG.4 – EE 20x- Tubuli seminiferi

Essi sono costituiti da una parete formata da una membrana propria e da un epitelio pluristratificato a struttura assai caratteristica.

La membrana propria risulta di uno strato interno e di uno esterno, il primo formato da una lamina basale con fibrille di collagene e fibroblasti, mentre il secondo ha una struttura fibroelastica e si continua direttamente nello stroma interlobulare.

L'epitelio pluristratificato o epitelio germinativo è la sede della spermatogenesi. Questo epitelio risulta irregolare anche per la presenza degli spermatozoi, che si raccolgono nel lume del tubulo. Nella sua compagine si distinguono due tipi di elementi e cioè le cellule di sostegno o cellule del Sertoli e le cellule seminali o cellule germinali.

Le cellule del Sertoli sono cellule epiteliali cilindriche, dal profilo irregolare, con un nucleo piriforme, che si estendono per l'intero spessore dello strato epiteliale, dalla

lamina basale sino al lume del tubulo seminifero. Queste cellule accolgono nelle loro insenature le cellule seminali, e nell'estremità distale le teste degli spermatozoi. Hanno per tanto una funzione tonica e trofica per le cellule della linea germinale.

Le cellule dell'epitelio germinativo si trovano fra gli elementi di sostegno e rappresentano vari stadi del processo di formazione degli spermatozoi o spermatogenesi.

Le cellule interstiziali o cellule del Leydig che, isolatamente o in piccoli gruppi, sono accolte nel contesto dello stroma connettivale intertubulare rappresentano la cosiddetta ghiandola interstiziale. Queste cellule, di forma poliedrica e spesso irregolare, rappresentano la principale fonte di produzione degli ormoni steroidei androgeni.

I tubuli retti hanno una lunghezza variabile da 200 a 400  $\mu\text{m}$  ed un diametro molto inferiore a quello dei tubuli seminiferi contorti, pertanto il passaggio fra i due avviene in maniera alquanto brusca. Le lacune della rete testis hanno un calibro variabile e possono raggiungere un'ampiezza anche di 300  $\mu\text{m}$ . Chiaramente i tubuli retti non presentano gli elementi della linea seminale, permanendo solo cellule di sostegno e procedendo verso la rete testis l'epitelio passa da pluristratificato a cubico o pavimentoso.

L'epitelio di rivestimento dei tubuli retti e della rete testis poggia su una sottile lamina basale all'esterno della quale si addensa il connettivo fibroso del mediastino, andando ad interrompere la membrana propria dei tubuli seminiferi contorti.

L'epididimo come già detto è costituito da un sistema canalicolare molto simile a quello dei tubuli retti e della rete testis e da un epitelio pseudo stratificato, sostenuto da uno strato fibro-muscolare.

## 2.2 Fisiologia ed endocrinologia del testicolo

Il testicolo ha sia una funzione gametogena (spermatogenesi) che una endocrina (testosterone) grazie alla quale influisce sulla maggior parte dei caratteri sessuali secondari e sull'attività sessuale.

### 2.2.1 Pubertà e spermatogenesi

La pubertà viene definita come l'età nella quale gli animali raggiungono la completa capacità riproduttiva. Il conseguimento della pubertà, risulta influenzato da molteplici fattori quali la razza, il grado di sviluppo, la temperatura ambientale, la stagione di nascita e soprattutto l'alimentazione, in quanto il raggiungimento della pubertà dipende più dal peso corporeo (40-70% del peso dell'adulto) che dall'età. Tuttavia si può dire che la pubertà negli arieti di razza sarda sia intorno al 5° mese di età. Con la pubertà, si

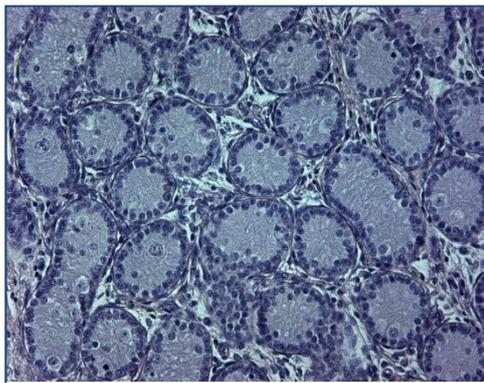


FIG. 5-Testicolo ariete impubere

elevano i livelli delle gonadotropine ed in particolare nel maschio, si ha un aumento dei livelli di testosterone a discapito degli estrogeni. A livello ipofisario, aumentano i recettori del GnRH, diminuendo a livello ipotalamico. Pertanto si ha la rimozione del blocco della secrezione di GnRH a livello ipotalamico determinando una maggiore ampiezza e frequenza dei picchi di LH. Il testicolo nel periodo pre-pubere presenta dei tubuli seminiferi composti da cellule somatiche di sostegno in attiva divisione mitotica che si differenzieranno in cellule del Sertoli e dai gametofiti, che daranno invece origine agli spermatogoni staminali di tipo A.

La *spermatogenesi* è l'intero processo che dallo spermatogone porta alla formazione dello spermatozoo. Consiste in una serie complessa di divisioni cellulari, accompagnate

da variazioni morfologiche. La spermatogenesi può essere a sua volta suddivisa in *spermatocitogenesi*, in cui avviene la meiosi che porta alla formazione degli spermatidi da spermatociti primari e *spermiogenesi*, in cui avvengono trasformazioni strutturali che portano alla formazione degli spermatozoi a partire dagli spermatidi.

- Spermatocitogenesi: Le cellule seminali primitive sono cellule diploidi che poggiano sulla membrana basale del tubulo e che vengono sottoposte a differenziazione appena prima della pubertà per dar luogo agli spermatogoni di tipo A0, dai quali originano le altre cellule seminali. Gli spermatogoni di tipo A1 si suddividono fino a quelli di tipo A4 che a loro volta daranno origine a quelli di tipo B. Gli spermatogoni di tipo B si suddividono almeno una volta per formare gli spermatociti di 1° ordine, che a loro volta vanno incontro a progressive modificazioni del nucleo (profase della meiosi) prima di suddividersi per formare gli spermatociti di 2° ordine che si dividono nuovamente e per l'ultima volta per andare a formare cellule aploidi dette *spermatidi*.

- Spermiogenesi: gli spermatidi sono trasformati in spermatozoi mediante una serie di progressive modificazioni morfologiche che comprendono la condensazione della cromatina nucleare, la formazione della coda o flagello e lo sviluppo del cappuccio acrosomiale e che avvengono in 4 fasi successive: *fase del Golgi*, *fase del cappuccio*, *fase dell'acrosoma* e *fase della maturazione*.

Tutto il processo che dallo spermatogone porta alla formazione degli spermatozoi richiede un intervallo di tempo costante, in condizioni fisiologiche normali, che prende il nome di ciclo dell'epitelio seminifero e nello specifico dell'ariete ha una durata di 47 giorni. La spermatogenesi è influenzata da diversi fattori, per tanto può subire, nell'arco della vita, delle modificazioni ed alterazioni che possono determinare un blocco completo o parziale della stessa che può essere reversibile o irreversibile.

Si può riscontrare un calo fisiologico della produzione di spermatozoi in determinati periodi della stagione riproduttiva, ma la spermatogenesi può variare anche in relazione allo stato fisiologico e nutrizionale dell'animale come in stati di cachessia e di patologie sia testicolari che sistemiche.

### 2.2.2 Barriera emato -testicolare

I tubuli seminiferi non sono provvisti di vasi ematici o linfatici e le cellule seminali al loro interno, sono protette dalle modificazioni chimiche del sangue grazie alla presenza di una barriera selettivamente permeabile. Le cellule del Sertoli, che presentano le giunzioni serrate della barriera emato-testicolare, hanno una funzione tonica e trofica per le stesse e per le cellule della linea germinale che ospitano. Questa barriera emato-testicolare è costituita da due componenti principali:

-Strato mioide: uno strato incompleto di cellule mioidi contrattili che avvolge i tubuli seminiferi, ma che nell'ariete risulta comunque poco sviluppato e quindi con uno scarso rilievo nella fisiologia del testicolo.

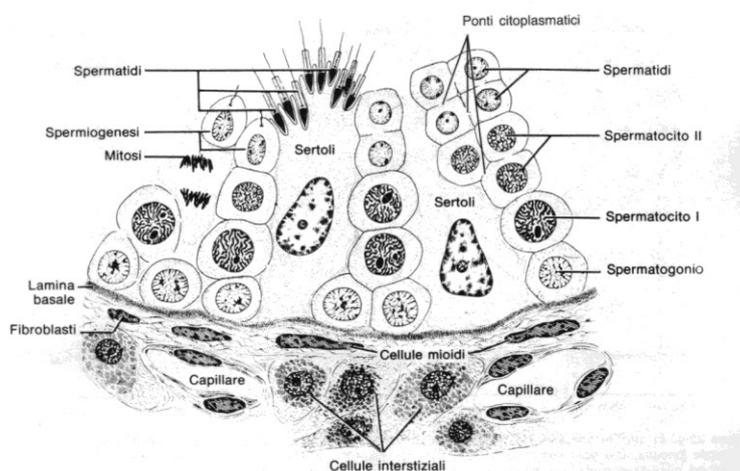


FIG.6 – Barriera emato-testicolare

-Giunzioni (gap junction) fra le cellule del Sertoli: sono complessi giunzionali tra le cellule del Sertoli adiacenti e rappresentano la principale barriera permeabile interposta tra sangue e testicolo. Queste giunzioni dividono i tubuli seminiferi in 2 distinti compartimenti: un compartimento basale , contenente spermatogoni e spermatociti nella fase di preleptotene ed un compartimento luminale che comunica con il lume del tubulo , contenente gli spermatociti nelle loro fasi più avanzate e gli spermatidi.

Il compartimento basale è facilmente accessibile da quelle sostanze che superano facilmente lo strato mioide , mentre il compartimento luminale è protetto dalla selettività delle giunzioni che escludono totalmente alcune sostanze. Questa barriera è importante per il mantenimento di un ambiente idoneo alla funzione spermatogenetica dei tubuli , perché impedisce il passaggio di alcune sostanze nel lume , ma contemporaneamente mantiene a livello del compartimento luminale concentrazioni ottimali di alcune sostanze come l'ABP ( Androgen Binding Protein) , l'inibina e gli enzimi inibitori.

Infine , un ulteriore e forse la più importante funzione di questa barriera , è quella di impedire reazioni immunologiche nei riguardi degli spermatidi e degli spermatozoi da parte del sistema immunitario dell'organismo. Infatti è risaputo che la competenza immunitaria viene acquisita a livello embrionale prima della formazione dei primi spermatozoi che come si sa viene completata in età pre-pubere ( Pelletier and Byers, 1992; Pelletier , 2011).

### **2.2.3 Endocrinologia**

L'attività endocrina del testicolo viene supportata dalle cellule del Leydig nel tessuto interstiziale e dalle cellule del Sertoli nei tubuli seminiferi.

-Le cellule del Leydig sono coinvolte nella produzione del testosterone. Questo ormone deriva, attraverso un processo di steroidogenesi, dal colesterolo esogeno del sangue o da

quello endogeno sintetizzato tramite beta-ossidazione degli acidi grassi. Il colesterolo a livello mitocondriale viene convertito a pregnenolone e successivamente a testosterone.

Le cellule del Leydig possiedono sulla membrana plasmatica recettori specifici per l'ormone ipofisario LH, che risulta coinvolto nella regolazione della produzione del testosterone tramite la conversione del colesterolo in pregnenolone.

La quantità di recettori per l'LH è regolata da vari ormoni quali: lo stesso LH, l'FSH, la prolattina (PRL) e il cortisolo. L'FSH e la prolattina aumentano i recettori per l'LH e di conseguenza la produzione di testosterone.

È bene ricordare che la secrezione di LH da parte dell'ipofisi è pulsatile, rispondendo alla stimolazione da parte del GnRH ipotalamico, pertanto la produzione di testosterone è discontinua e segue nello specifico l'andamento dell'LH.

Il testosterone si trova in forma libera nel sangue in ridotta concentrazione (2-3%), che è comunque la porzione direttamente utilizzabile, mentre la maggior parte è legato con alta affinità ad una specifica globulina TeBG e con bassa affinità ad una albumina, e rappresenta una riserva di testosterone. Il testosterone è indispensabile per il mantenimento della spermatogenesi, agendo probabilmente sia sulla divisione meiotica che sulla differenziazione morfologica degli spermatozoi. Anche il comportamento sessuale e la libido sono testosterone dipendenti, così come lo sviluppo corporeo e il dimorfismo sessuale e lo sviluppo di tutti i caratteri sessuali secondari.

Le cellule del Leydig producono anche estradiolo.

-Le cellule del Sertoli producono principalmente estrogeni e diidrotestosterone (DHT) a partire dal testosterone. Inoltre queste cellule producono: l'inibina, che entra nella liberazione ipofisaria di FSH; una proteina (ABP) che lega testosterone e DHT, aumentandone la concentrazione a livello tubulare ed epididimale; un attivatore di plasminogeno che interviene nella regolazione dell'apertura delle gap junctions della

barriera emato-testicolare; una proteina (MIH) che inibisce lo sviluppo dei derivati del dotto del Muller; infine una sostanza GnRH simile, che si ipotizza abbia una attività stimolante la steroidogenesi da parte delle cellule del Leydig.

Il testicolo per la sua regolazione endocrina è strettamente dipendente dall'ipotalamo e dall'ipofisi, per tanto si parla di asse ipotalamo-ipofisi-testicolo. La secrezione ipotalamica di GnRH determina la liberazione ipofisaria di LH ed FSH. L'LH a sua volta determina la liberazione di testosterone da parte delle cellule del Leydig, mentre l'FSH stimola la liberazione da parte delle cellule del Sertoli dell'ABP, del DHT e degli estrogeni. Questi ultimi intervengono nel feedback negativo sulla liberazione ipotalamica di GnRH e dell'inibina, che a sua volta determina l'inibizione a livello ipofisario della liberazione di FSH. Anche il testosterone inibisce direttamente la liberazione ipotalamica di GnRH, così come la stessa concentrazione ipotalamica del GnRH ipotalamico e quella ipofisaria di LH.

## **2.3 Tecniche di deplezione della linea germinale**

### **2.3.1 Trattamenti reversibili**

Diversi fattori influenzano in maniera reversibile la spermatogenesi. Tra questi riconosciamo alterazioni a carico della temperatura e la concentrazione del testosterone nel sangue.

*-Temperatura:* Come noto il mantenimento a livello testicolare di una temperatura inferiore di 4-5°C inferiore rispetto a quella corporea è essenziale per una normale spermatogenesi (Waites, 1970; Setchell, 1978). L'aumento della temperatura a livello del testicolo, frequente in diverse patologie, determina un aumento del metabolismo e della richiesta di ossigeno che non viene supportata dalla vascolarizzazione del testicolo, determinando ipossia con successivo deterioramento della produzione degli spermatozoi

(Setchell, 1978; Setchell, 1998). Pertanto un trattamento ipertermico a livello del testicolo può determinare l'eliminazione delle cellule della linea germinale ( Rockett et al., 2001).

*-Testosterone:* La spermatogenesi è un processo testosterone dipendente , per tanto alterazioni a carico del medesimo ormone possono determinare una inibizione del processo di maturazione degli spermatozoi( Jégou et al., 1991; Sofikitis et al., 2008). Viste le correlazioni tra secrezione di GnRH e Testosterone, diversi autori su diverse specie hanno utilizzato un vaccino Anti-GnRH (Improvac®) per inibire la secrezione del testosterone, determinando una regressione testicolare con evidente deplezione a carico delle cellule della linea germinale (Xian et al., 2002; Zamaratskaia et al., 2008; Einarsson et al., 2009; 2011)

### **2.3.2 Trattamenti irreversibili**

Altri fattori come le radiazioni e farmaci chemioterapici , diversamente dai precedenti , grazie al loro effetto citotossico sono in grado di distruggere in maniera irreversibile le cellule della linea germinale.

*-Radiazioni:* l'utilizzo di radiazioni a livello del testicolo per eliminare la linea cellulare germinale è stato studiato da diversi autori su diverse specie ( Izadyr et al., 2003; Oatley et al., 2005). Nonostante presenti il vantaggio di essere un trattamento locale e focalizzato, risulta limitato dalla dose delle radiazioni molto variabile e dalle difficoltà logistiche ed economiche di attuazione del trattamento ( Honoramooz et al., 2005).

*-Chemioterapici:* un trattamento citotossico tramite Busulfan è stato frequentemente utilizzato in diverse specie per determinare una deplezione della linea germinale (Brinster and Zimmermann, 1994; Olejnik et al., 2005). Tuttavia è bene ricordare che la

dose di Busulfan per ottenere la sterilizzazione è specie- specifica e che un trattamento può risultare letale.

## **2.4 Tecniche chirurgiche di inoculo**

Diverse approcci chirurgici per accedere ai tubuli seminiferi sono stati descritti da altri autori su diverse specie (Honaramooz et al., 2002; 2003; Rodriguez et al., 2006; 2009 )

- Incannulazione dei dotti efferenti
- Iniezione dalla rete testis extratesticolare
- Iniezione diretta nella rete testis intratesticolare

## 2.5 Cellule staminali

### 2.5.1 Definizione e caratteristiche

Nonostante non esista una definizione omnicomprensiva ed esaustiva di “cellula staminale”, si può catalogare come staminale, una cellula che si divide dando origine a due cellule diverse tra loro, una cellula figlia uguale alla cellula madre che costituisce il pool di riserva delle staminali e una cellula figlia diversa che viene identificata con il nome di progenitore e anche se può dividersi numerose volte, non può farlo indefinitamente (perdita della staminalità). Prima o poi tutta la sua progenie differenzierà in un solo tipo (cellula staminale unipotente) o in diversi tipi (cellula staminale multipotente) cellulari (Burdon et al., 2002; Sherley, 2002).

Le cellule staminali possiedono alcune importanti caratteristiche che le distinguono dagli altri tipi cellulari:

- sono prive di un'attività specifica all'interno dell'organismo, se non quella di costituirne una riserva;
- sono capaci di replicarsi per lunghi periodi dando origine a cellule identiche a se stesse;
- in presenza di appositi stimoli si trasformano in cellule con funzioni specifiche (ad esempio una cellula muscolare, nervosa o epatica) seguendo quindi un processo differenziativo.

### 2.5.2 Classificazione

In base alla capacità di differenziare, le cellule staminali vengono classificate in totipotenti, pluripotenti, multipotenti e unipotenti.

1. **Totipotenti**: sono le più versatili fra le staminali, danno origine a tutte le cellule completamente differenziate del corpo e alle cellule del trofoblasto della placenta, sono in grado di dar vita ad un intero organismo, convogliando la sua progenie in tutti gli indirizzi differenziativi. Questa totipotenza può avere diversa durata a seconda della specie, per esempio nel topo dura fino al quarto giorno di divisione embrionale.

2. **Pluripotenti**: come le cellule staminali totipotenti, possono dare origine a tutti i tipi di tessuto, ma non possono dar luogo ad un intero organismo. Al quarto giorno di sviluppo, l'embrione è suddividibile in due strati, uno strato esterno che diventerà la placenta, ed una massa cellulare interna che darà origine all'embrione. Queste cellule interne, anche se possono formare quasi tutti i tessuti, non possono in realtà procedere senza il prezioso aiuto dello strato più esterno, quindi non sono più totipotenti, ma pluripotenti. Poiché queste cellule staminali pluripotenti continuano a dividersi, inizia per loro il processo di specializzazione che porterà ai diversi tipi cellulari.

3. **Multipotenti**: sono meno plastiche e più differenziate delle precedenti. Esse danno origine a un numero finito di cellule differenziate e sono solitamente isolate da tessuti adulti. Si possono identificare nella progenie delle cellule pluripotenti diventando le progenitrici di linee cellulari come le cellule del sangue, cellule della pelle e le cellule nervose. Possono diventare uno dei diversi tipi di cellule all'interno di un determinato organo. Per esempio, le cellule staminali multipotenti del sangue possono svilupparsi in globuli rossi, globuli bianchi o piastrine.

4. **Unipotenti:** si differenziano in un unico tipo di cellula specializzata. Per esempio nel midollo osseo esistono cellule staminali che sono in grado di dare origine solo ai globuli rossi e non ai globuli bianchi.

### 2.5.3 Origine

Le cellule staminali possono essere:

i) Embrionali, si tratta di cellule pluripotenti e possono essere isolate da *embrioni allo stadio di blastocisti* e dalle *Creste Gonadali Fetali*, ma queste sono meno stabili delle embrionali.

ii) Adulte-Mesenchimali si tratta di cellule multipotenti e unipotenti, possono essere isolate dal *cordone ombelicale, midollo osseo e placenta*.

iii) Amniotiche, si tratta di una nuova fonte di cellule staminali. Possono essere isolate dal *liquido amniotico* tra la 10<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> settimana di gravidanza. In esso sono presenti diverse popolazioni cellulari con caratteristiche biologiche simili alle staminali embrionali ed adulte (De Coppi et al., 2007).

### 2.5.4 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)

Sono cellule staminali multi e unipotenti, tessuto specifiche che presentano un'origine eterogenea. In verità sono molto rare rispetto alla totalità di cellule che costituiscono un tessuto, basti pensare che troviamo una cellula staminale adulta ogni 10000 cellule del midollo osseo, inoltre il loro numero può variare a seconda della specie, dell'origine e si riduce con l'età. Esse risultano organizzate in nicchie dalle quali provvedono alla sostituzione continua delle cellule dei tessuti in cui sono localizzate, al mantenimento e alla riparazione degli stessi dopo un danno. Tali cellule si riscontrano anche in quei tessuti dell'organismo che non sono sottoposti ad un continuo rinnovo, come quello

muscolare o nervoso. Questo risulta essere un punto di grande interesse per tutti i ricercatori che si occupano di patologie fortemente degenerative a carico proprio dell'apparato muscolare e nervoso, perché apre la strada a validissime alternative terapeutiche.

Fino ad oggi sono state utilizzate quasi esclusivamente quelle emopoietiche (HSC) ottenute dal midollo osseo (1-3%) o dal sangue periferico (0.01-0.1%), a scopo di trapianto. Il midollo osseo contiene anche un secondo tipo di staminali adulte molto rare (0.1-0.5%), le cellule staminali mesenchimali (MSC). Recenti studi hanno dimostrato che le staminali emopoietiche e le mesenchimali, in particolari condizioni, sono in grado di differenziarsi in cellule con differenti specificità tissutali (trans differenziazione: capacità della cellula staminale adulta di differenziare in cellule mature diverse dal tessuto di origine). I tessuti dell'adulto fornitori di cellule staminali sono: midollo osseo, sangue, sistema nervoso, muscolo, fegato, cute. Per via della loro plasticità tale tipologia di cellule occupano un ruolo cardine nella terapia cellulare, anche se il loro utilizzo più esteso è ostacolato dalla loro incapacità a dividersi indefinitamente così come invece fanno le embrionali.

### **2.5.5 Caratterizzazione delle MSC**

Le MSCs non possiedono un solo fenotipo, ma esprimono markers presenti anche in altri tipi cellulari. Questo può essere dovuto a diversi fattori quali per esempio una variabilità di espressione dovuta al tipo di tessuto dal quale le MSCs vengono isolate, al metodo di isolamento e di coltura ed alle diverse specie animali dalle quali vengono estratte. Infatti numerosi studi sull'isolamento delle MSCs da diverse specie animali e da diversi tessuti hanno portato alla conclusione che alcune molecole vengono espresse (STRO-1, CD105,

CD73, CD44, CD90, CD106, CD166, CD29, CD71, GD2, CD146), mentre altre sono sempre assenti (CD45, CD34, CD11B e CD14).

In particolare il CD44 è una molecola di adesione cellulare che gioca un ruolo centrale nell'organizzazione della matrice extracellulare del midollo. È sempre espressa sulle MSC isolate da midollo osseo di specie diverse, infatti è risultata positiva sulle MSC isolate da midollo osseo di diverse specie compresa la pecora (Cristino et al., 2004, Mancuso et al., 2009).

È invece necessario escludere la presenza di molecole specifiche delle linee ematopoietiche (Pittinger et al., 1999; Miao et al., 2006). In particolare il CD34, specifico delle cellule staminali emopoietiche, ma anche il CD45 che è espresso con alta densità su linfociti.

Le cellule staminali mesenchimali esprimono diverse proteine che partecipano all'organizzazione del citoscheletro. L'importanza del citoscheletro nella differenziazione delle MSCs è legata alle sue proprietà meccaniche, di organizzazione e di elasticità (Settleman, 2004). Le molecole che determinano l'elasticità del citoscheletro delle MSCs del midollo osseo sono rappresentate da desmina e vimentina che costituiscono i filamenti intermedi (Yoon et al., 2003; Becker et al., 2006). La Vimentina si trova nelle cellule embrionali di origine mesenchimale: fibroblasti, leucociti, cellule endoteliali. La sua funzione è di circondare l'involucro nucleare, in particolare è associata alla componente citoplasmatica del complesso del poro nucleare.

L'introduzione della citometria a flusso ha rappresentato un enorme progresso nella ricerca e nella caratterizzazione delle cellule staminali emopoietiche, in quanto ha consentito una caratterizzazione fenotipica dettagliata e l'individuazione di markers specifici rivelatisi indispensabili per lo sviluppo delle metodiche di separazione cellulare (Flow Cytometry cells sorting-FACS, magnetic cell sorting-MACS). Tali metodiche

hanno permesso l'utilizzo di anticorpi monoclonali per l'isolamento e la purificazione di popolazioni cellulari rare. Nel sistema FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) si misura la fluorescenza emessa da cellule individualmente marcate all'interno di una popolazione mista. Si considera il Forward Scatter o Scatter lineare (FSC), se il fascio di luce emesso è in funzione del diametro della cellula e se è prevalentemente determinato dalla rifrazione; si considera invece il Side Scatter (SSC), se il fascio di luce emesso è in funzione del diametro della cellula, della granulosità del citoplasma e del rapporto nucleo/citoplasma e se è prevalentemente determinato dalla riflessione e dalla rifrazione. La combinazione dei due tipi di segnali dà origine ad un particolare diagramma di dispersione denominato "citogramma", nel quale è possibile risolvere le popolazioni cellulari in base alla loro complessità nucleare.

### 3 SCOPO DEL LAVORO

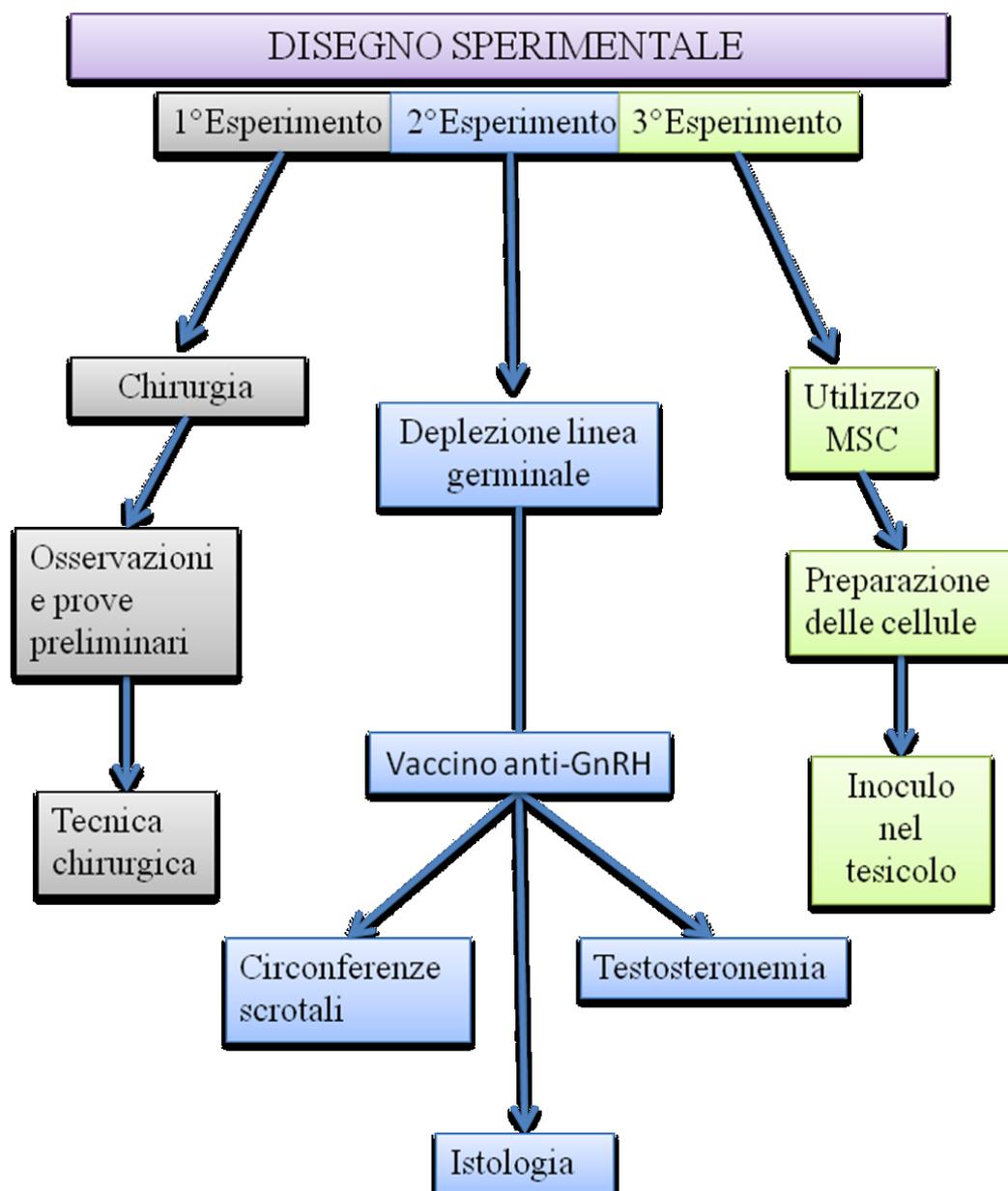
Lo scopo del lavoro è quello di:

- a) mettere a punto una tecnica chirurgica per l'inoculo di cellule che assicuri la successiva ripresa delle normali funzioni testicolari;
- b) scegliere un metodo per eliminare le cellule germinative autoctone dell'animale ricevente per creare le condizioni ottimali per un eventuale colonizzazione da parte di cellule eterologhe;
- c) valutare le capacità di distribuzione e colonizzazione delle cellule staminali nel testicolo.

## 4. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato svolto presso l'Agris- DIRPA (Dipartimento della Ricerca nelle Produzioni Animali) - Servizio Zootecnico - Settore Scientifico Riproduzione S.S. 291 Km 18.6 , Sassari (Italy).

Tutti gli animali utilizzati in questo lavoro sono stati trattati nel rispetto del benessere animale.



#### ***4.1 Primo esperimento: “Messa a punto di una tecnica chirurgica per l’inoculo di cellule nel testicolo”***

***Obiettivo dell’esperimento:*** Mettere a punto una tecnica chirurgica per l’inoculo di cellule che assicuri la successiva ripresa delle normali funzioni testicolari.

##### **4.1.1 Osservazioni e prove preliminari in testicoli “Ex-Vivo”**

I testicoli di arieti di razza sarda di diversa età, sono stati raccolti presso mattatoi locali e trasportati in termo-box a 4°C presso il nostro laboratorio. I testicoli sono stati isolati dagli invogli testicolari, per accedere alla localizzazione della rete testis extra-testicolare.



FIG.7- Rete Testis extra-testicolare



FIG.8 - Rete Testis extra-testicolare

Si è proceduto allo scollamento della testa dell’epididimo, tramite forbici per microchirurgia, fino a raggiungere la parte caudo-ventrale della stessa, sede della rete testis extra-testicolare (FIG. 7-8).

*-Prove di inoculo:* sono stati utilizzati a dosi diverse (5-10-20 ml) la fucsina basica, l’eosina nigrosina e il Trypan Blue precedentemente filtrati ed iniettati tramite un catetere intravenoso (24-Ga) introdotto nella rete testis extra-testicolare per via eco guidata, al fine di valutare la diffusione del colorante nei tubuli seminiferi.

#### 4.1.2 **Tecnica chirurgica “in vivo”**

Per questo lavoro sono stati utilizzati 5 arieti di razza sarda adulti di circa un anno di età , nei quali è stato iniettato un colorante a fluorescenza Mitotracker Green (Invitrogen). Gli animali, previo esame obiettivo dell'apparato genitale (EOP) ed ecografia testicolare , sono stati sedati con acepromazina come pre-anestetico (0,4 ml) e successivamente anestetizzati con Penthotal Sodium® (500-700 mg) e le regioni scrotale ed inguinale sono state preparate per la chirurgia.

Un'incisione di circa 8 cm è stata effettuata nella parte medio-craniale dello scroto , a circa 4 cm e parallelamente al rafe mediano dello stesso (FIG.9). Il testicolo ancora avvolto dalla tonaca vaginale è stato estratto dallo scroto. Un'altra incisione leggermente più piccola della precedente, è stata fatta a livello della tonaca vaginale per liberare completamente il testicolo racchiuso al suo interno (FIG.10-11). Esposto il testicolo , è stata scollata la testa dell'epididimo dal testicolo tramite una forbice da microchirurgia e spostata all'indietro fino alla completa esposizione della rete testis extra-testicolare (FIG.12). Un catetere pediatrico intravenoso (24-Ga) è stato introdotto per circa 5-7 mm nella rete testis extra-testicolare per via eco guidata con una sonda lineare da 7,5 MHz (FIG.13) . Una siringa da insulina con 500 µl di aria è stata connessa al catetere e con una leggera pressione è stata iniettata l'aria nel mediastino testicolare per espandere la cavità virtuale e per confermare la giusta posizione. Successivamente 4 ml di colorante a fluorescenza sono stati iniettati nel mediastino , molto lentamente per favorire un flusso piccolo ma costante all'interno dello stesso. Immediatamente dopo, il testicolo è stato riportato all'interno della tonaca vaginale assieme alla testa dell'epididimo e la tonaca è stata chiusa con 3 punti di sutura ad U alternati (FIG.14-15-16). Infine il testicolo è stato riportato all'interno dello scroto che è suturato con 5 punti di sutura singoli (FIG.17-18).

Dopo l'intervento, è stata effettuata una terapia post-operatoria, comprendente un trattamento antibiotico standard ed un trattamento antinfiammatorio a base di cortisone della durata di 5 giorni.



FIG.9



FIG.10



FIG.11



FIG.12

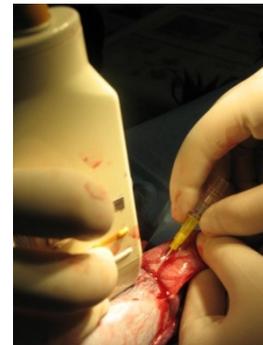


FIG.13

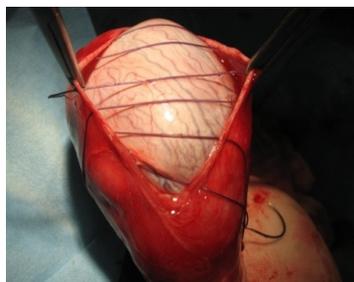


FIG.14



FIG.15



FIG.16



FIG.17



FIG.18

#### 4.1.3 Valutazione post-operatoria del testicolo

A 48h dall'intervento è stato effettuato l'EOP dei testicoli, per valutare l'eventuale aumento di volume dello scroto e dei testicoli, la dolorabilità, l'ipertermia e la motilità degli stessi all'interno dello scroto (FIG.19). A 45 giorni dall'intervento 3 animali su 5 sono stati fatti saltare tramite vagina artificiale per valutare la capacità del salto e la qualità dell'eiaculato.



FIG.19-Testicolo dopo 48h

#### 4.1.4 Valutazione post-operatoria della distribuzione del colorante nel testicolo

Due settimane dopo l'intervento 2 animali sono stati castrati ed il tessuto testicolare, pochi minuti dopo la castrazione, è stato incluso in un fissativo Optimal Cutting Temperature e successivamente delle sezioni seriali di 5  $\mu\text{m}$  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 (Evans and Maxwell, 1987)

## **4.2 Secondo esperimento: “Effetti del vaccino anti-GnRH su arieti di 8 mesi”**

**Obiettivo dell’esperimento:** Eliminare dai tubuli seminiferi la linea cellulare germinale e inibire la spermatogenesi in maniera reversibile.

### **4.2.1 Scelta degli animali e disegno sperimentale**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 10 agnelli di razza sarda di età compresa tra 7-8 mesi. Dopo aver misurato la circonferenza scrotale (CS) ed effettuato un prelievo di sangue periferico, gli animali sono stati divisi in due gruppi: un **gruppo 1** (n=5) trattato con vaccino anti- GnRH (Improvac(®)) ed un **gruppo 2** (n=5) di controllo. Successivamente, sono stati collezionati campioni di sangue periferico ed è stata misurata la circonferenza scrotale a cadenza settimanale per 12 settimane. A 90 giorni dal primo trattamento, 2 animali di entrambi i gruppi sono stati castrati per la valutazione istologica dei tubuli seminiferi. Dopo 200 giorni è stata fatta una valutazione quali-quantitativa del seme ed una prova di fertilità.

### **4.2.2 Trattamento con il vaccino Anti-GnRH**

A tutti gli animali di entrambi i gruppi, è stato fatto l’ EOP dell’apparato genitale ed è stata misurata la circonferenza scrotale (CS). Gli animali del **gruppo 1** sono stati vaccinati (1 ml) tramite un iniezione sottocutanea a livello ascellare. ripetuta dopo 4 settimane. Agli animali del **gruppo 2** non è stato effettuato alcun trattamento.

Il trattamento ed i controlli sono iniziati nel mese di Marzo.

#### **4.2.3 Misurazione circonferenza scrotale e prelievi di sangue**

Dal giorno 30 a cadenza settimanale, per 12 settimane, sono stati effettuati dei prelievi di sangue periferico tramite provette sottovuoto (Vacutainer) senza anticoagulante, quindi centrifugate per ottenere siero, successivamente stoccato a -20°C fino al giorno delle analisi. Inoltre dall'inizio del trattamento sempre a cadenza settimanale a ciascun animale, di entrambi i gruppi, è stata misurata la circonferenza scrotale tramite calibro.

#### **4.2.4 Valutazione concentrazione testosteronemia**

I campioni di siero sono stati utilizzati per il dosaggio ELISA del testosterone utilizzando il kit InterMedical per la determinazione immunoenzimatica quantitativa del testosterone totale nel siero. Le analisi sono state effettuate presso BioVetLab.

#### **4.2.5 Valutazione epitelio seminifero**

A 90 giorni dal primo trattamento, 2 animali di entrambi i gruppi sono stati castrati, diversi campioni del testicolo 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 modificazioni a livello dei tubuli seminiferi, sono state osservate utilizzando il microscopio Nikon Eclipse 80i e le immagini sono state fotografate tramite un digital computer images Nikon Ds-f11 camera.

#### **4.2.6 Valutazione seme**

Dopo 200 giorni dal primo trattamento, su 2 animali di entrambi i gruppi è stata effettuata la valutazione quali-quantitativa del seme. 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 (Evans and Maxwell, 1987).

#### 4.2.7 Valutazione fertilità

Per valutarne la fertilità, 2 arieti del **gruppo 1** sono stati fatti accoppiare con 10 pecore precedentemente sincronizzate. A 42 giorni è stata effettuata la diagnosi di gravidanza ecografica.

### **4.3 Terzo esperimento: “Inoculo di cellule staminali mesenchimali”**

**Obiettivo dell'esperimento:** Valutare le capacità di distribuzione e colonizzazione delle cellule staminali nel testicolo.

#### **4.3.1 Preparazione delle cellule**

*Gli esperimenti relativi a questa sezione sono stati eseguiti presso i laboratori dell'AGRIS- DIRPA- Sassari e presso i laboratori di Porto Conte Ricerche – Sassari.*

##### **4.3.1.1 Isolamento e coltura di cellule staminali mesenchimali ovine da midollo osseo**

Le cellule staminali mesenchimali sono state isolate dal midollo osseo secondo il protocollo di Mancuso et al. 2008. Cinque millilitri di aspirato di midollo osseo, recuperati dalla cresta iliaca della pecora, sono stati diluiti con un egual volume di PBS (Phosphate- Buffered Saline, Sigma , St. Luois, MO, USA) . Questa soluzione è stata stratificata sopra uno strato di Hystopaque 1077 (Sigma-Aldrich) e centrifugata a 1500 g per 30 minuti per ottenere la frazione cellulare mononucleare. L'interfaccia tra l'hystopaque e il plasma sottostante, è stata delicatamente recuperata usando una pipetta e posizionata in un diversa provetta, successivamente diluita 1:1 con PBS e centrifugata a 400 g per 10 minuti. Il surnatante è stato rimosso e gli eventuali eritrociti rimasti sono stati lisati, utilizzando una soluzione di lisi commerciale (BD Pharm Lyse, Milano,Italia) . Dopo centrifugazione a 200 g per 10 minuti, il pellet è stato risospeso in un medium di coltura completo, costituito da Alpha Minimal Essential Medium (Sigma), 20% di FBS( Foetal Bovine serum; Sigma), 1% di soluzione di penicillina e streptomina (Sigma-Aldrich) e 2mM di L-glutamina. Le cellule nucleate sono state contate utilizzando la

camera di Thoma e piastrate ad una densità di  $0,6-1 \times 10^6$  cellule per  $\text{cm}^2$  in fiasche da 75ml. Dopo incubazione overnight a  $37^\circ\text{C}$  in atmosfera umidificata, contenente il 5 % di  $\text{CO}_2$ , le cellule non adese sono state rimosse ed è stato aggiunto del medium fresco. Le colture cellulari sono state mantenute per 2 settimane (cioè fino a raggiungere l'80-90% di confluenza) rimuovendo le cellule non adese e cambiando completamente il medium di coltura ogni 3 giorni. Successivamente le cellule sono state raccolte con l'utilizzo di tripsina allo 0,1 % e di EDTA allo 0,04% per 8 minuti a  $37^\circ\text{C}$  e riseminate ad una densità di  $1,5 \times 10^4 \times \text{cm}^2$ . Il medium è stato cambiato ogni 2 giorni fino ad ottenere il numero di cellule necessario per l'inoculo.

#### **4.3.1.2 Raccolta delle cellule aderenti e conta cellulare**

La raccolta delle cellule aderenti è stata effettuata utilizzando Tripsina (0.1%) usata in combinazione con EDTA (0.04%). Dopo trattamento enzimatico, il terreno dalla fiasca è stato aspirato e si sono effettuati 3 lavaggi con phosphate-buffered saline (PBS, Sigma, St.Louis, Mo,USA). Al terreno è stata aggiunta la soluzione di Tripsina/EDTA e le cellule sono state lasciate in incubazione a  $37^\circ\text{C}$  per 8 minuti. L'avvenuto distacco è stato accertato tramite osservazione microscopica e l'interruzione dell'azione proteolitica è stata effettuata con l'aggiunta di terreno completo di siero. La sospensione è stata raccolta e centrifugata per ottenere il pellet che è stato successivamente risospeso in un volume noto di terreno.

Per effettuare la conta cellulare, è stato utilizzato un emocitometro in un volume totale di 1.09 ml. La conta delle cellule consisteva nella media di tre conteggi per ogni campione.

#### **4.3.1.3 Caratterizzazione fenotipica della coltura di cellule staminali**

Le cellule raccolte con trattamento a base di tripsina (0.1%)+EDTA (0.04%), venivano fissate in paraformaldeide al 4% per 20 min, in seguito lavate in PBS e dopo risospese in PBS+ bovine serum albumin (BSA) allo 0.1%. Aliquote di cellule ( $10^5/100 \mu\text{l}$ ) venivano incubate per 20 min in ghiaccio con anticorpo monoclonale seguito da 2 lavaggi in PBS +0.1% di BSA e talvolta era necessaria un'ulteriore incubazione con un anticorpo secondario coniugato per 20 min a temperatura ambiente. Sono state effettuate marcature con anticorpi monoclonali coniugati con Fluoresceina isotiocianato (FITC) contro CD44, CD45, CD34 ed un anticorpo monoclonale non coniugato specifico per la Vimentina.

L'analisi dei risultati ottenuti sull'acquisizione al citofluorimetro (FacsCalibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) veniva eseguita con il software CellQuest (BD Bioscience, CA,USA).

#### **4.3.1.4 Colorazione delle cellule tramite colorante a fluorescenza PKH26**

Le cellule sono state colorate con il colorante PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich) seguendo le istruzioni del kit con opportune modifiche. In breve, le cellule recuperate dalle fiasche in coltura, sono state raccolte in unica falcon da 15ml e successivamente contate tramite la camera di Thoma. Le falcon sono state centrifugate a 200g per 5 minuti a 25°C e successivamente è stato aspirato il surnatante e risospeso il pellet in medium senza siero (DMEM) in un'unica falcon da 50 ml con una quantità di medium proporzionale alle dimensioni del pellet. Dopo un'ulteriore centrifugata a 400g per 5 minuti a 25°C, è stato aspirato il surnatante al posto del quale è stato aggiunto 1 ml/o 500  $\mu\text{l}$  di diluente C ogni  $2 \times 10^7$  cellule, e successivamente risospeso. Contemporaneamente è stata preparata la miscela di colorazione 4  $\mu\text{M}$  (4  $\mu\text{l}$  di colorante

in 1 ml di diluente, ogni  $2 \times 10^7$  cellule), successivamente aggiunta alle cellule pipettando delicatamente. Le cellule successivamente sono state messe in incubatore a 25°C per 3-5 minuti . Infine è stata fermata la reazione di colorazione aggiungendo un ugual volume di siero ed incubando per 1 minuto a 25°C . Il campione ottenuto è stato diluito con PBS con 10% di FBS, centrifugato a 400 g per 10 min a 25°C per rimuovere la soluzione di colorazione. Una volta rimosso il surnatante il pellet cellulare è stato lavato con PBS + 10% di FBS e risospeso in 5 ml di PBS.

#### 4.3.1.5 Trasduzione delle cellule con vettore retro virale

Le cellule staminali mesenchimali sono state seminate in piastre di 40mm di diametro. Il giorno dopo la semina le cellule avevano raggiunto una confluenza pari al 30%, a questo stadio sono state sottoposte ad un lavaggio con DMEM privo di FBS ed antibiotici. Successivamente è stata preparata la miscela di Polibrene aggiungendo 10 µl di Polibrene in 10 ml di DMEM sempre senza FBS né antibiotici. (Murgia et al., 2011; Bahnson et al., 1995; O'Doherty et al., 2000) . Alla miscela di Polibrene è stato aggiunto il costrutto costituito dal vettore virale (JSRV-based) che in questo studio deriva dalla molecola infettiva JSRVclone pCMV2JS21 (Palmarini et al., 1999) con all'interno la sequenza pCJS-EfGFP-mC. Dopo aver rimosso il medium, la miscela del costrutto è stata aggiunta nella piastra, che è stata incubata per 2 h.



FIG.20- MSC

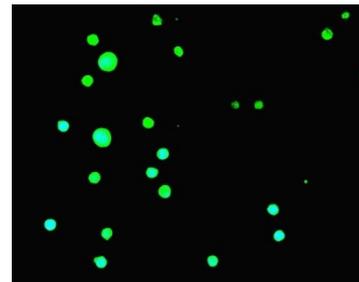


FIG.21- MSC marcate

Successivamente sono stati aggiunti alla coltura 3 ml di DMEM completo, ovvero con FBS 10%, PSN( penicillina- streptomicina-neomicina) ed Aminoacidi Non essenziali ed incubata over-night. Il giorno seguente, la coltura è stata lavata 2 volte con PBS Ca<sup>++</sup> free + PSN e sono stati aggiunti 4 ml di DMEM completo. Dopo 48h, valutata la fluorescenza, le cellule sono state tripsinizzate e ri-seminate in fiasche da 75 ml ed incubate.

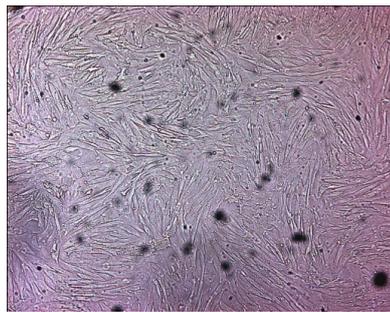


FIG.22- MSC

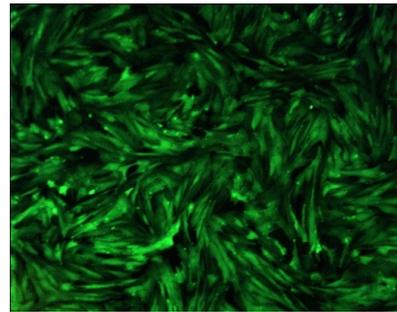


FIG.23- MSC marcate

#### 4.3.2 Inoculo cellule staminali nel testicolo “in vivo”

Due animali di età compresa tra i 7-8 mesi, sono stati precedentemente trattati con il vaccino anti-GnRH per eliminare la linea germinale autoctona. A metà del trattamento vaccinale (80-90° giorno), seguendo la chirurgia precedentemente descritta (pag. 31-33), le cellule staminali mesenchimali marcate sono state inoculate a due diverse concentrazioni (2 animali  $100 \times 10^6$  e 2 animali  $300 \times 10^6$ ). Le cellule risospese in 5ml di PBS sono state inoculate sempre in un testicolo, mentre nel testicolo contro laterale, utilizzato come controllo, è stati iniettati solo 5 ml di PBS. Dopo una settimana, 1 animale è stato castrato ed i testicoli sono stati fissati per l'istologia e l'immunofluorescenza. Il restante animale è stato castrato a 21 giorni dall'intervento.

### 4.3.3 Preparazione campioni istologici

Diversi campioni del testicolo sono stati fissati con formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina per essere sezionati a circa 4  $\mu\text{m}$  di spessore e colorati con Ematossilina ed Eosina. Sulle sezioni testicolari sono state, inoltre, eseguite ulteriori colorazioni istochimiche, quali Tricromia di Masson e Verhoeff's, per evidenziare rispettivamente il tessuto connettivo e le fibre elastiche nelle strutture vascolari. La valutazione delle sezioni istologica è stata fatta utilizzando un microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i) equipaggiato di un sistema digitale di acquisizione di immagini (Nikon Ds-fi1).

Immunofluorescenza: a seguito della castrazione del soggetto, al fine di valutare l'eventuale colonizzazione dei tubuli seminiferi da parte di cellule staminali precedentemente marcate, sezioni rappresentative del testicolo sono state crio-conservate ed incluse in Optimal Cutting Temperature. (OCT) per essere sezionate a 5- $\mu\text{m}$  attraverso l'utilizzo di un criostato (Leica, Reichert-Jung, Heidelberg, Germany). Le sezioni così ottenute, sono state montate su vetrini carichi positivamente (Superfrost slides -Fisher Scientific) per ottimizzare le procedure di immunofluorescenza. Le sezioni sono state, quindi, lavate in PBS (pH 7.4) contenente 0.02% Tween 20 ( $3 \times 5$  min) a temperatura ambiente (R.T.) e sottoposte a contrasto nucleare con HOECHST h33342 (1:1000 dilution; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in PBS (pH 7.4) per 1 minuto a temperatura ambiente. La fluorescenza è stata osservata utilizzando un microscopio confocale (filter-free confocal laser scanning microscope -Leica TCS SP).

## 5. RISULTATI

### 5.1 Primo esperimento: “Messa a punto di una tecnica chirurgica per l’inoculo di cellule nel testicolo”

#### 5.1.1 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 diffuse solamente nel mediastino e nelle zone immediatamente limitrofe ad esso (FIG. 24). Mentre molto più efficace è stato l’utilizzo del Trypan Blue, che si è diffuso uniformemente nel testicolo (FIG.25-26).



FIG. 24-Fucsina Basica



FIG. 25- Trypan Blue

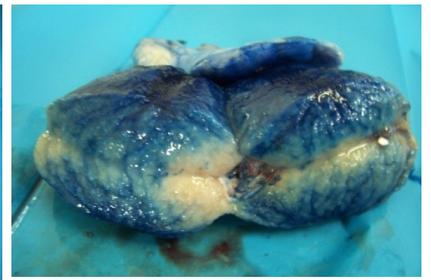


FIG.26-Trypan Blue

### 5.1.2 Valutazione post-operatoria del testicolo

Gli animali operati a 48h dall'intervento non presentavano aumento di volume, né ipertermia, inoltre i testicoli erano mobili all'interno dello scroto. A 45 giorni dall'intervento 3 arieti sono stati fatti saltare tramite vagina artificiale (FIG.27), dimostrando il completo recupero della funzionalità testicolare e della attività sessuale attraverso la produzione di un eiaculato normale.



FIG.27-Prelievo seme

### 5.1.3 Valutazione seme

Tutti i campioni sono risultati fluorescenti (FIG.28). Tutti gli spermatozoi mostravano una fluorescenza, localizzata esclusivamente nel collo degli spermatozoi, sede elettiva del colorante utilizzato (FIG.29). La fluorescenza è stata riscontrata solo al primo salto dopo l'intervento.

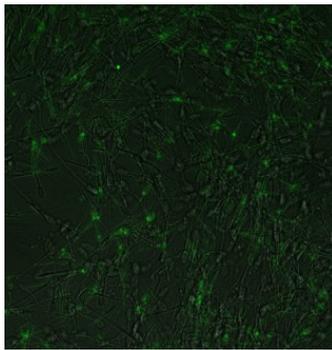


FIG.28-Spermatozoi 20x

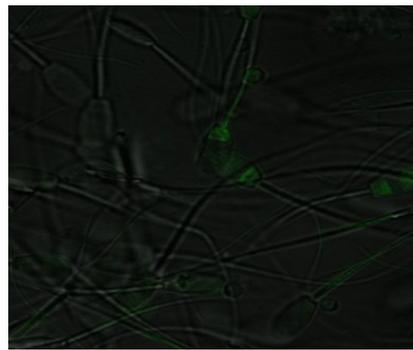


FIG.29-Spermatozoi 40x

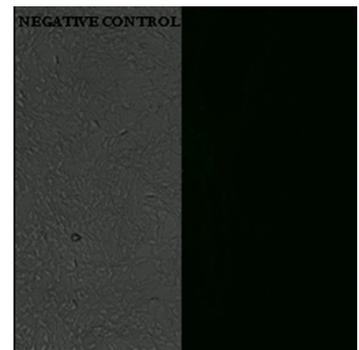


FIG.30- Controllo Negativo

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

#### 5.1.4 Valutazione post-operatoria della distribuzione del colorante nel testicolo

Tutti i campioni valutati sono risultati fluorescenti (FIG.31). In essi si riconoscono le strutture caratteristiche del testicolo, quali i tubuli seminiferi, dimostrando la completa distribuzione del colorante.

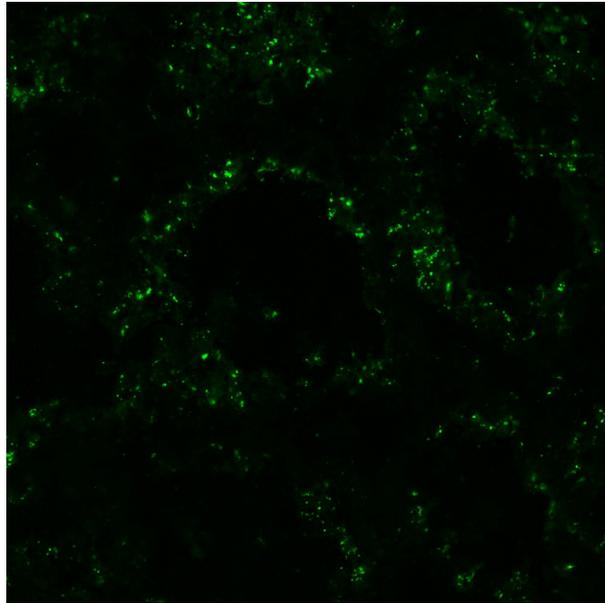


FIG.31 – Tubuli Seminiferi

## 5.2 Secondo esperimento: “Effetti del vaccino anti-GnRH su arieti di 8 mesi”

### 5.2.1 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).

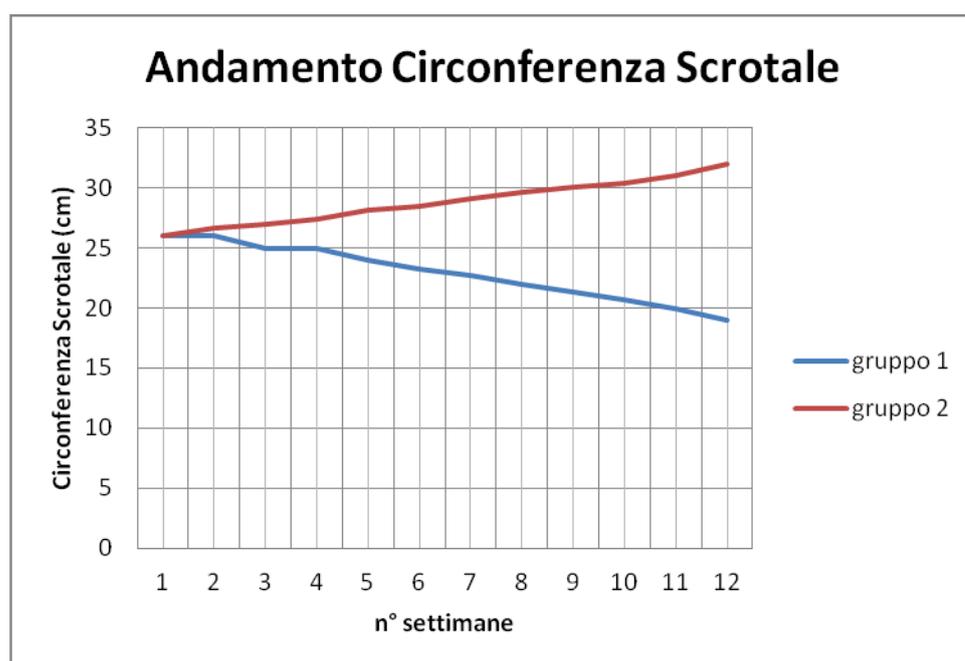


GRAFICO 1

Nel **gruppo 1**, le C.S. hanno raggiunto la misura minima a circa metà del trattamento (12<sup>a</sup> 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 (DNR).

### 5.2.2 Concentrazione 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<sup>a</sup> 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**.

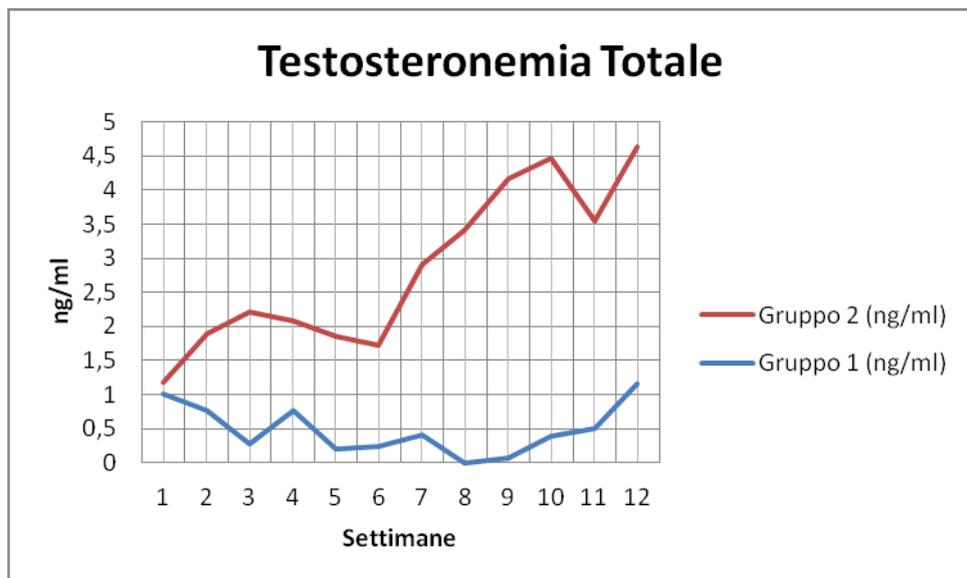


GRAFICO 2

### 5.2.3 Valutazione istologica dei tubuli seminiferi

➤ *DESCRIZIONE MICROSCOPICA GRUPPO 1 (Trattati):*

Negli spazi intertubulari si osserva la presenza di lieve congestione vascolare associata ad edema diffuso ( FIG.32). 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 (FIG.33-34).

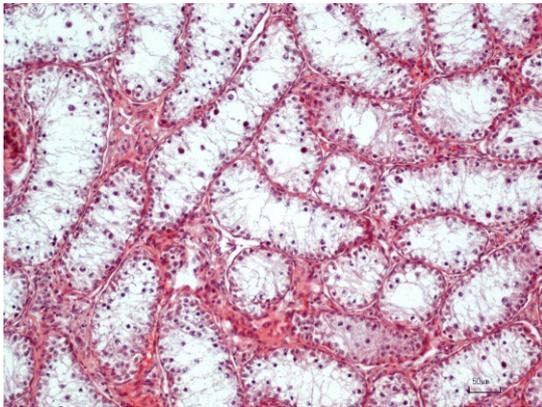


FIG.32 EE 10x- Tubuli Seminiferi vaccinati

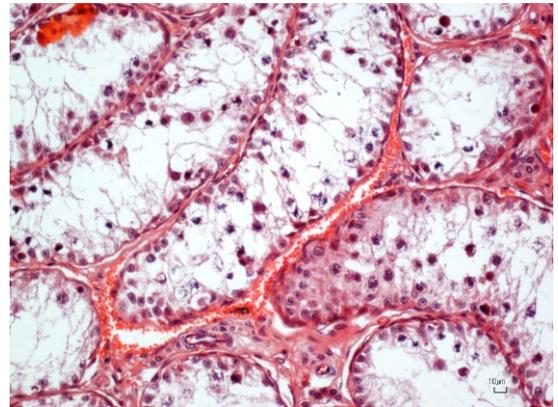


FIG.33 EE 20x- Tubuli Seminiferi vaccinati

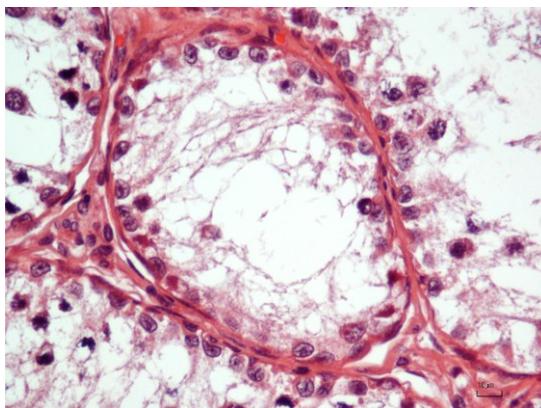


FIG.34 EE 40x- Tubuli Seminiferi vaccinati

➤ *DESCRIZIONE MICROSCOPICA GRUPPO 2 (Controllo):*

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 (FIG.35-36).

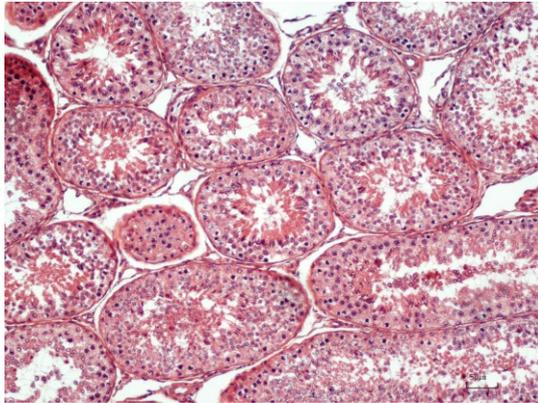


FIG.35 EE.20x- Tubuli Seminiferi controllo

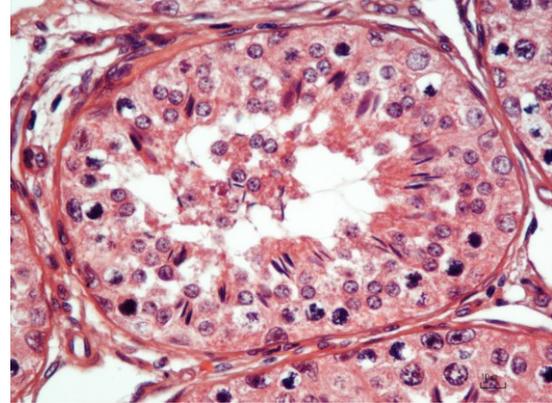


FIG.36 EE.40x Tubuli Seminiferi controllo

#### 5.2.4 **Valutazione del seme**

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

#### 5.2.5 **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.

### 5.3 Terzo esperimento: “Inoculo di cellule staminali mesenchimali”

#### 5.3.1 Caratterizzazione delle MSC

Con l'analisi citofluorimetrica, le MSCs sono risultate positive per CD44 (Fig.37a) e Vimentina (Fig 37b), infatti gli eventi del citogramma si trovano sopra la retta limite, mentre gli eventi si trovano al di sotto della retta limite per CD34 (Fig.37c) e CD45 (Fig.37d) quindi il risultato era negativo come ci aspettavamo.

Fig. 37a

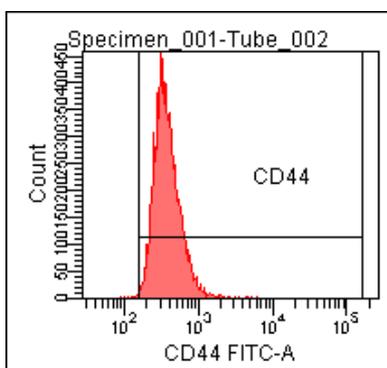


Fig.37 b

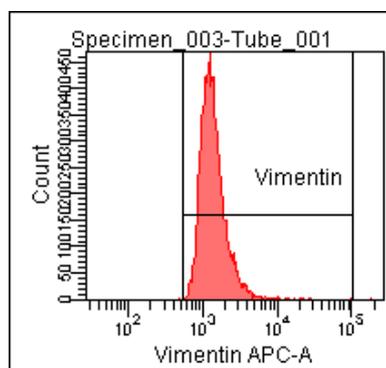


Fig.37 c

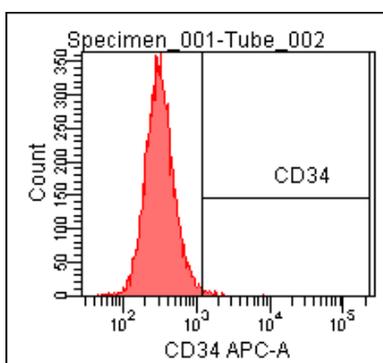
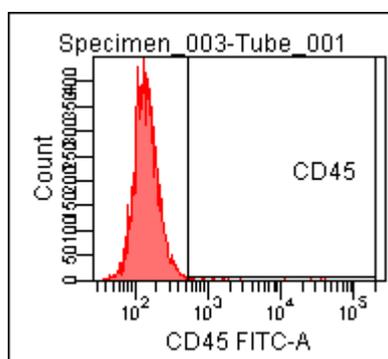


Fig.37d



### 5.3.2 Valutazione distribuzione delle cellule tramite immunofluorescenza

In tutti i campioni NON si è riscontrata la presenza di cellule marcate, nè all'interno dei tubuli seminiferi, nè nell'interstizio ( FIG.38).

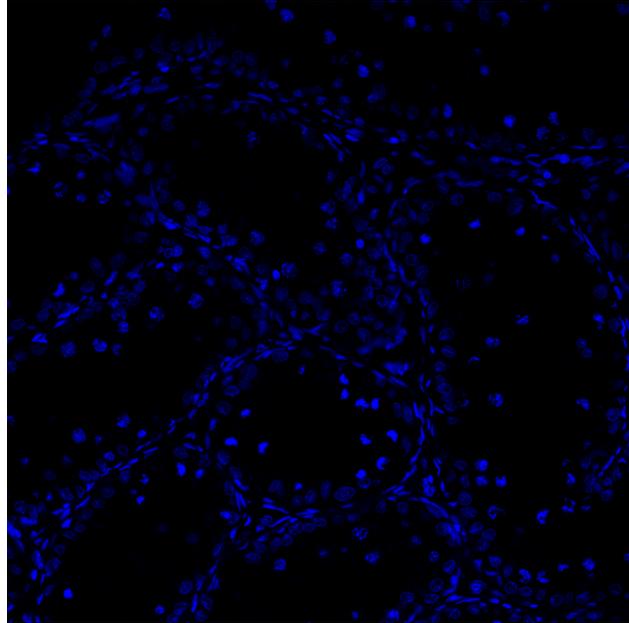


FIG.38- Tubuli seminiferi colorazione nucleare di contrasto

### 5.3.3 Descrizione macroscopica dei testicoli

#### ➤ DESCRIZIONE TESTICOLI DOPO 7 GIORNI :

Si osservano lievi e diffusi fenomeni congestizi e nessuna apparente degenerazione rilevante a carico del parenchima testicolare (FIG.39).

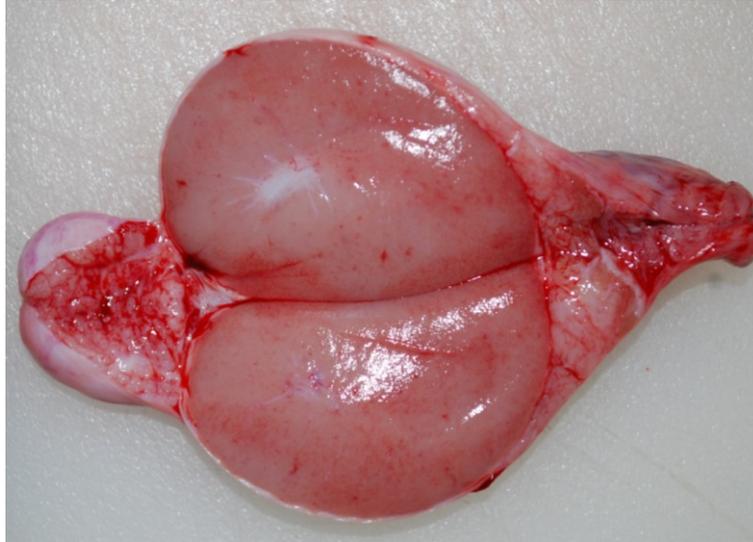


FIG.39- Testicolo dopo 7 giorni dall'inoculo

#### ➤ DESCRIZIONE TESTICOLI DOPO 21 GIORNI

Si osserva un notevole ispessimento della tonaca albuginea e grave necrosi testicolare a localizzazione sub-albuginea , con fenomeni congestizio-emorragici multifocali intraparenchimali (FIG.40).



FIG.40- Testicoli dopo 21 giorni dall'inoculo

### 5.3.4 Descrizione microscopica dei testicoli

➤ *DESCRIZIONE TESTICOLI DOPO 7 GIORNI :*

Nell'albuginea si osserva lieve ectasia e congestione vascolare. Multifocalmente, i tubuli presenti prevalentemente in localizzazione sub-albuginea mostrano abbondante materiale eosinofilo granulare frammisto ad ombre e detriti cellulari (necrosi). Nel connettivo intertubulare si osserva un moderato numero di cellule del Leydig. La maggior parte della linea germinale presenta compromissione della linea spermatogonica da moderata a diffusa ( FIG.41,42,43).

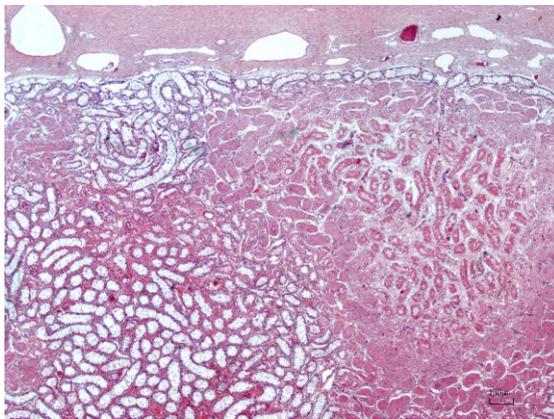


FIG.41 EE 4x -Tubuli Seminiferi dopo 7gg

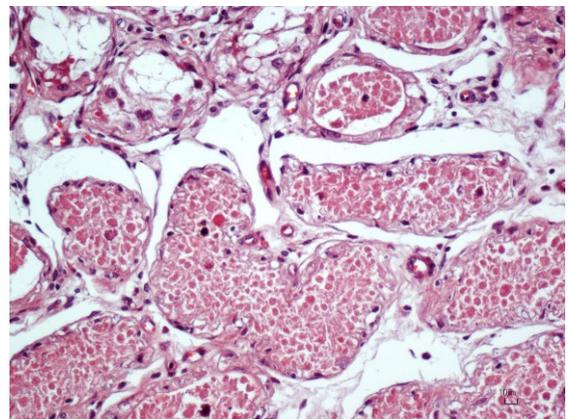


FIG.42 EE 10x- Tubuli Seminiferi dopo 7gg

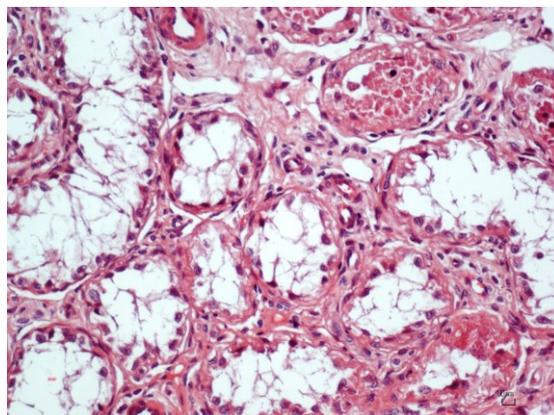


FIG.43 EE 20x -Tubuli Seminiferi dopo 7gg

➤ *DESCRIZIONE TESTICOLI DOPO 21 GIORNI*

E' presente un grave e diffuso ispessimento della tonaca albuginea con moderata ectasia e congestione vascolare. Si osserva inoltre proliferazione intimale e progressiva obliterazione vascolare e lieve fibrosi periavventiziale. I tubuli mostrano necrosi subalbuginea grave e zonale associata a quadri di calcificazioni distrofica. I tubuli seminiferi mostrano graduale ripristino della linea spermatogonica, nella quale si osservano fenomeni di degenerazione (FIG. 44,45,46,47,48).

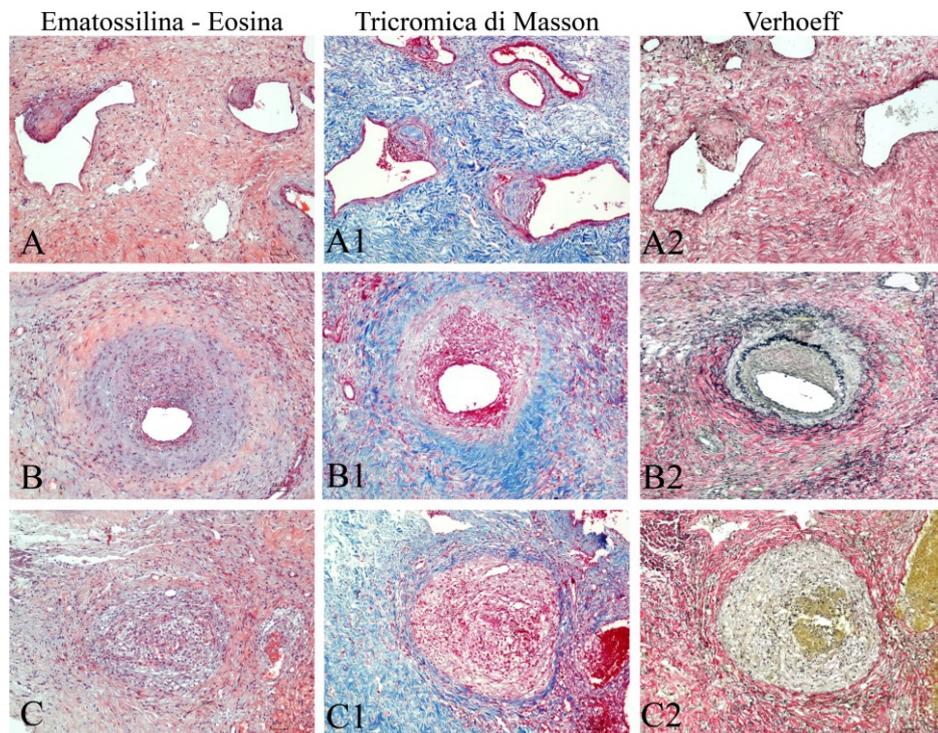


FIG. 44- Vasi presenti nell'albuginea

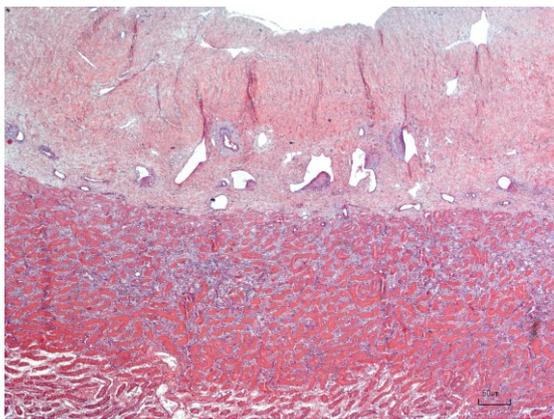


FIG.45 EE 4x -Tubuli Seminiferi dopo 21 gg

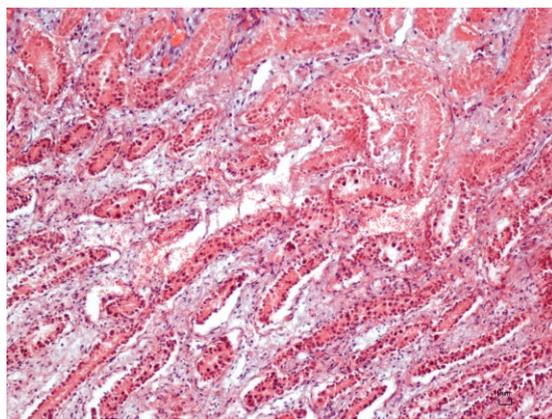


FIG.46 EE 10x -Tubuli Seminiferi dopo 21 gg

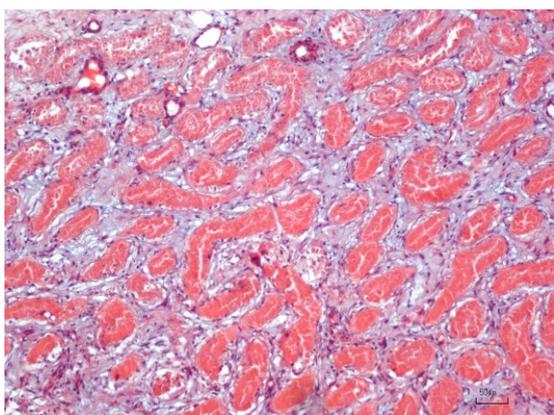


FIG.47 EE10X -Tubuli Seminiferi dopo 21 gg

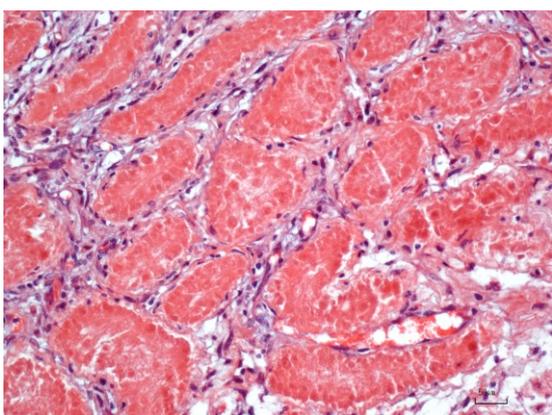


FIG.48 EE 20x -Tubuli Seminiferi dopo 21 gg

## 6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

### *6.1 Primo esperimento: “Messa a punto di una tecnica chirurgica per l’inoculo di cellule nel testicolo”*

I risultati presentati in questo studio dimostrano che l'intervento chirurgico, nonostante sia piuttosto invasivo, non determina delle alterazioni irreversibili a carico del testicolo e sulla normale attività sessuale degli animali. Nel periodo post-operatorio, infatti, non si è riscontrato alcun aumento di volume dell'organo, nè tantomeno ipertermia o presenza di dolorabilità. Infine anche il mantenimento della mobilità del testicolo all'interno dei suoi invogli è abbastanza significativa e sta ad indicare la buona riuscita dell'intervento senza aver determinato degenerazioni e aderenze a carico del parenchima testicolare. È generalmente riportato che le patologie acquisite più comuni a carico del testicolo come l'orchite e altre condizioni degenerative, sono accompagnate da lesioni caratteristiche quali congestione vasale, presenza di essudato nella tonaca vaginale, di tipo emorragico nei fenomeni acuti e di tipo fibro-purulento nei fenomeni cronici sempre associate ad un aumento di dimensione del testicolo ( Siddiqui et al., 2005).

A differenza di Rodriguez et al. (2009), che presenta una tecnica chirurgica simile alla nostra, abbiamo deciso, una volta effettuato l'inoculo, di non ricucire la testa dell'epididimo all'albuginea sottostante per ridurre al massimo le lesioni al parenchima testicolare. Abbiamo piuttosto agito sulla posizione del taglio a livello della tonaca vaginale, effettuato lontano dalla testa dell'epididimo. La stessa infatti, una volta riportato l'organo in toto all'interno della tonaca vaginale, viene comunque mantenuta in sede dalla stessa tonaca vaginale che avvolge strettamente il testicolo.

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. Anche questo risultato è importante in quanto come descritto da Samad et al. (1980) tutte le condizioni patologiche a carico del testicolo, sia congenite che acquisite, determinano 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. In conclusione nelle nostre condizioni sperimentali, l'approccio di un medium per via extra testicolare dà buoni risultati. Tutto ciò è concorde con le considerazioni di Rodriguez et al. (2006;2009), i quali sostengono che l'approccio dalla rete testis extra-testicolare sia il metodo migliore per facilitare la diffusione delle cellule nei tubuli seminiferi e la loro eventuale successiva colonizzazione.

## ***6.2 Secondo esperimento: “Effetti del vaccino anti-GnRH su arieti di 8 mesi”***

L'utilizzo di un vaccino anti GnRH determina un'inibizione della secrezione del testosterone e quindi di tutte quelle funzioni strettamente collegate ad esso (Xian et al., 2002; Zamaratskaia et al., 2008; Einarsson et al., 2009; 2011). 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 somministrazione di un vaccino anti-GnRH, seguita da una successiva somministrazione dopo 4 settimane, determina la regressione del volume testicolare ed una diminuzione della concentrazione del testosterone nel sangue periferico. Infatti sia le circonferenze scrotali che la testosteronemia nel corso delle 12 settimane diminuiscono in maniera costante, in contrasto con il gruppo di controllo che invece prosegue il suo normale e graduale accrescimento. Questi dati sono simili a quelli riportati nel maiale da altri autori (Xian et al., 2002; Zamaratskaia et al., 2008; Einarsson et al., 2009; 2011). Tuttavia è bene specificare che probabilmente possono avere influito sui valori dell'andamento delle circonferenze scrotali e della testosteronemia sia l'età dell'animale, comunque ancora in fase di sviluppo, sia il periodo dell'inizio del trattamento, in quanto il periodo di marzo- aprile è considerato al di fuori della normale stagione riproduttiva in Sardegna, come riportato da Manunta et al. (1981), che purtroppo non riporta la descrizione istologica del parenchima testicolare nel medesimo periodo. La soppressione dell'accrescimento testicolare accompagnata dalla diminuzione della testosteronemia ha trovato delle conferme istologiche. Infatti a 90 giorni dall'inizio del trattamento all'interno dei tubuli seminiferi risultano presenti solo la linea cellulare del Sertoli accompagnata da occasionale presenza di spermatogoni. Una situazione opposta si nota nel gruppo di controllo che presenta istologicamente delle caratteristiche nella

norma con la presenza della completa linea germinale e con spermatozoi nel lume tubulare.

Inoltre una drastica riduzione della concentrazione del testosterone nel sangue periferico suggerisce una ipofunzionalità delle cellule del Leydig, che nel testicolo trattato appaiono diminuite nel numero e nella grandezza, come dimostrato da studi precedenti (Hilbe et al., 2006; Einarsson et al., 2009).

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.

### ***6.3 Terzo esperimento: "Inoculo di cellule staminali mesenchimali"***

La positività al citofluorimetro per CD44 e Vimentina ha confermato la staminalità delle cellule isolate dal midollo osseo come descritto da Mancuso et al. (2008). Confermata la buona riuscita dell'intervento chirurgico purtroppo sia a 7 giorni che a 21 giorni non è stato possibile valutare l'efficienza della distribuzione e della colonizzazione delle cellule inoculate a livello dei tubuli seminiferi per la presenza di un inaspettato fenomeno di necrosi ischemica più o meno diffusa. Sfortunatamente non abbiamo trovato lavori che potessero avvalorare l'evento riscontrato nel nostro esperimento. Infatti l'unico lavoro di Lue et al. (2007) che inocula nel testicolo cellule staminali mesenchimali in testicoli di topo non riporta fenomeni simili a carico del parenchima testicolare. Tuttavia altri autori che inoculano tipi cellulari differenti (spermatogoni) su diverse specie animali di interesse zootecnico, riescono ad ottenere una complessiva distribuzione a livello dei

tubuli seminiferi che oscilla dal 22% (Rodriguez et al., 2009) al 18% (Herrid et al., 2006) che tuttavia diminuisce drasticamente con il passare del tempo fino allo 0,2% (Rodriguez et al., 2009) ed 1 % (Herrid et al., 2006). Questi risultati sono in contrasto con quanto accade nei topi che raggiungono il 70-100% della distribuzione a livello dei tubuli seminiferi (Parreira et al., 1998; Nagano et al., 1999). Tale differenza nelle percentuali di colonizzazione dipende secondo Rodriguez et al. (2006) dal numero di tubuli pronti ad accogliere le cellule, dal numero di cellule inoculate e dalla scelta degli animali riceventi e del metodo di deplezione della linea germinale dello stesso.

Perreira et al. (1998) elimina chimicamente e quindi irreversibilmente la linea germinale nei topi e raggiunge un ottima percentuale di colonizzazione. Diversamente Herrid et al. (2006) e Rodriguez et al. (2009) utilizzano per i loro lavori animali in età pre-pubere per evitare l'utilizzo di metodiche di deplezione più complesse. In questi casi però la percentuale di colonizzazione è notevolmente inferiore. Questo potrebbe essere dovuto a fattori di competizione tra la linea germinale dell'animale ricevente e le cellule inoculate. Tuttavia nessuno di questi autori menziona delle alterazioni simili a quelle riscontrate nel nostro lavoro.

In questo studio l'utilizzo del vaccino anti- GnRH per eliminare la linea germinale dell'animale ricevente ha dato risultati molto soddisfacenti per quanto riguarda la morfologia del tubulo seminifero che presentava le sole cellule del Sertoli, ed un lume pervio. Quindi vi erano delle condizioni del tutto simili a quelle riscontrate negli animali in età pre-pubere. L'inoculo delle cellule staminali è stato effettuato a circa metà del trattamento vaccinale, quando il testosterone era in fase di risalita. Questa condizione era ipotizzabile essere la migliore per la natura delle cellule staminali, che sono influenzate da diversi fattori micro ambientali che possono stimolare la differenziazione verso un tipo cellulare piuttosto che in un altro (Wagers et al., 2004; Kucia et al., 2005;

Dattena et al., 2009). Per questo abbiamo deciso di lasciare le medesime cellule nel testicolo rispettivamente per 7 e 21 giorni, ipotizzando dei tempi comunque abbastanza lunghi per l'eventuale interazione e colonizzazione delle cellule del Sertoli .

Tuttavia i risultati negativi ottenuti dall'immunofluorescenza hanno sicuramente sottolineato dei possibili errori di valutazione nella scelta del vaccino o del periodo di inoculo , poiché inibendo la linea seminale solo in maniera reversibile, la linea germinale autoctona rappresenta nella sua fase di ricrescita un elemento di competizione per le cellule eterologhe.

Sia a 7 che a 21 giorni purtroppo non è stato possibile valutare la percentuale di colonizzazione, avendo riscontrato un fenomeno inaspettato di necrosi ischemica in entrambi i testicoli. Macroscopicamente abbiamo riscontrato delle lesioni non gravi nel testicolo a 7 giorni, mentre dopo 21 giorni è presente un quadro molto più grave accompagnato da un notevole ispessimento della tonaca albuginea e grave necrosi testicolare a localizzazione sub-albuginea , con fenomeni congestizio-emorragici multifocali intraparenchimali.

Questo quadro ed andamento delle lesioni è confermato microscopicamente , dove i testicoli che hanno ricevuto le cellule staminali mesenchimali già dopo soli 7 giorni presentano delle degenerazioni a carattere zonale a carico del parenchima testicolare , associate alla presenza di materiale cellulare necrotico. Queste lesioni risultano esacerbate ai 21 giorni dove a carico dei tubuli seminiferi si osserva una importante necrosi di natura ischemica ipotizzabile come una evoluzione della precedente lesione. Il nostro quadro patologico si può definire progressivo. A 7 giorni presenta una lieve ectasia dei vasi associata ad una necrosi ischemica di tipo zonale a carico dei tubuli seminiferi con un andamento di tipo acuto. In maniera differente dopo 21 gioni abbiamo

un quadro sub-acuto, con grave compromissione dei vasi dell'albuginea e necrosi diffusa dei tubuli seminiferi.

La necrosi ischemica a carico di un tessuto o di un organo dovuta ad improvvisa diminuzione dell'apporto di sangue arterioso o, più raramente, del drenaggio di sangue venoso. Questo fenomeno è quindi associato al mancato apporto di ossigeno, e ad un conseguente mancato apporto di sostanze necessarie al mantenimento del metabolismo. Nella maggior parte dei casi l'ischemia è determinata da processi patologici a carico delle arterie come trombosi, embolia e stenosi ed infine occlusione meccanica dei vasi. Questo fenomeno interessa solitamente organi con irrorazione arteriosa terminale. È ipotizzabile quindi che sia una delle medesime cause ad aver provocato un'occlusione progressiva dei vasi a livello dell'albuginea anche nel nostro caso. Tuttavia l'assenza di cellule infiammatorie complica ulteriormente il quadro.

In conclusione l'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali va sicuramente studiata in maniera più approfondita per poterne valutare la diffusione e la colonizzazione. La via d'accesso al testicolo, il tipo cellulare ed il numero di cellule rimangono tutte variabili in grado di modificare questo quadro.

## 6. 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.
- Bahnson AB, Dunigan JT, Baysal BE, Mohny T, Atchison RW, et al. (1995) **Centrifugal enhancement of retroviral mediated gene transfer**. J Virol Methods 54: 131–143.
- 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.
- Becker B.E., Gard D.L., (2006). **Visualization of the cytoskeleton in Xenopus oocytes and eggs by confocal immunofluorescence microscopy**. Methods Mol. Biol, 322: 69-86.
- 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.
- Burdon T, Smith A, Savatier P. (2002). **Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells** Trends Cell Biol.; 12:432-438.
- Clayton J. Brinster, Boum-Yong Ryu, M.R. Avarbock, Levent Karagenc, R. L. Brinster and K.E. Orwig., (2003). **Restoration of fertility by Germ cell**

**transplantation Requires effective Recipient preparation.** *Biology of Reproduction*; 69:412-420.

- Cristino S., Grassi., Toneguzzi S., Piacentini A., Grigiolo B., (2004). **Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold.** *Interscience*, 276-282.
- 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.
- Dattena M., Pilichi S., Rocca S., Mara L, Casu S, Masala G, Manunta L, Manunta A, Sanna Passino E., Pool Roy R and Cappai P., (2009). **Sheep embryonic stem-like cells transplanted in fullthickness cartilage defects.** *J Tissue Eng Regen Med*; 3: 000–000
- De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A., (2007). **Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy.** *Nat Biotechnol.*;25(1):100-6.
- 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 development and 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;
- Kucia M, Reza R, Jala VR, Bawn B, Ratajczak MZ. **Bone marrow as a home of heterogenous populations of non hematopoietic stem cells.** Leukemia 2005, 19:1118-1127;
- 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
- Mancuso L, Liuzzo MI, Fadda S, Pisu M, Cincotti A, Arras M, Desogus E, Piras F, Piga G, La Nasa G, Concas A, Cao G. Cell Prolif. 2009 **Experimental analysis and modelling of in vitro proliferation of mesenchymal stem cells**. Oct;42(5):602-16. Epub 2009 Jul 10.
- Manunta, G. , Floris, B. e Cappai, P. 1981. **Attivita circannuale delle gonadi nell'ariete di razza Sarda.** Arch. Vet. Ital. 3J2, 117-123.
- Miao Z., Jin J., Chen L., Zhu J., Huang W., Zhao J., Quain X., Zhang X., (2006). **Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells**. Cell Biology International, 30: 681-687;
- 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 G.R and G.M.H. Waites., (1963). **Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum** Reprod. Fertil. 5: 433-446;
- Murgia C, M. Caporale, O. Ceesay, G. Di Francesco, N. Ferri, V. Varasano, M. de las Heras, M. Palmarini., (2011). **Lung Adenocarcinoma Originates from Retrovirus Infection of Proliferating Type 2 Pneumocytes during Pulmonary Post-Natal Development or Tissue Repair**. PLoS Pathogens; Volume 7 , Issue 3.
- 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*;
- O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH (2000) **Human immunodeficiency virustype 1 spinoculation enhances infection through virus binding.** *J Virol* 74:10074–10080;
- Olejnik 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;
- Palmarini M, Sharp JM, De las Heras M, Fan H., (1999). **Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep.** *J Virol* 73: 6964–6972;
- 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;
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W, Craig S., Marshak D.R., (1999). **Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells.** *Science* 284:143-147;

- 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.10<sup>Th</sup> Ind. Cong. Anim. Reprod and A.I.Urbana. Vol IV.XIV 25-53 ;
- Senger P.L, **Pathway to pregnancy and parturition** second edition 2003;
- Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. (2007). **Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy.** Nat Biotechnol.;25:100-6;
- Setchell BP. (1978). **The mammalian testis.** Ithaca: Cornell University Press;
- Setchell BP. (1998). **Heat and Testis.** J Reprod fertil; 114:179-94;
- Settleman J., (2004). **Tension precedes commitment-even for a stem cell.** Mol Cell. 23;14:148-50;
- Sherley JL., (2002). **Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture.** Stem Cells.; 20:561-572;
- 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;
- Sofikitis 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, 116:639-648;
- 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;
- Weissman IL., (2000) **Stem cells:units of development, unit of re generation, and units in evolution**. Cell, 100:157-158;
- 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;