

RISULTATI PRELIMINARI SULL'ANALISI DEI GLICOSAMMINOGLICANI IN TESTICOLI SANI E CRIPTORCHIDI DI SUINO

PRELIMINARY RESULTS ON GLYCOSAMINOGLICAN ANALYSIS IN NORMAL AND CRYPTORCHID BOAR TESTES

¹ AMEDEO S., ¹ CAPUCCHIO M.T., ³ APICELLA M., ¹ GUARDA F., ² MIOLETTI S.

¹ *Dipartimento di Patologia Animale, Grugliasco (TO) e Centro di Referenza di Patologia Comparata
Bruno Maria Zaini, Torino;* ² *Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria, Grugliasco (TO);*

³ *CN I Regione Piemonte*

Parole chiave: criptorchidismo, glicosamminoglicani, suino, testicolo

Key Words: boar, cryptorchidism, glycosaminoglycans, testis

RIASSUNTO

Il criptorchidismo è una delle più diffuse patologie riguardanti lo sviluppo dell'apparato genitale maschile nella specie umana, correlato spesso a complicazioni come infertilità, neoplasie e disturbi ormonali. I glicosamminoglicani sono macromolecole fondamentali della matrice extracellulare e rivestono moltissime funzioni fisiopatologiche nell'organismo. In questo lavoro abbiamo voluto analizzare dal punto di vista biochimico la composizione in glicosamminoglicani di testicoli normali e criptorchidi di suino, per evidenziare eventuali differenze tra tessuto sano e patologico.

ABSTRACT

Cryptorchidism is the most frequent defect of the male urogenital tract in humans, correlated with long-term complications (infertility, testicular neoplasia, and hormonal changes). Glycosaminoglycans are fundamental macromolecules of the extracellular matrix and they are involved in a wide range of physiological and pathological functions. The aim of this work is the biochemical analysis of glycosaminoglycans in normal and cryptorchid boar testes to highlight possible differences between normal and pathological tissue.

INTRODUZIONE

Il criptorchidismo, cioè la mancata discesa dei testicoli nello scroto, è considerata nell'uomo la patologia congenita più importante nello sviluppo, presente in più dell'1% dei bambini sotto i tre mesi di età, le cui maggiori conseguenze cliniche sono rappresentate da un elevato rischio d'infertilità e d'insorgenza di cancro testicolare nell'adulto. Esso può coinvolgere un solo testicolo (criptorchidismo monolaterale) o entrambi (criptorchidismo bilaterale). L'eziologia di tale patologia è idiopatica, multifattoriale e sembra in parte dovuta a uno squilibrio nel metabolismo degli ormoni steroidei e a un difetto dell'asse ipotalamo-ipofisario. Recenti studi hanno dimostrato che nella genesi del disturbo possono essere coinvolti fattori ambientali, come il contatto con sostanze chimiche (es. ftalati, pesticidi, detergenti) e lo stile di vita, oppure una predisposizione genetica. I glicosamminoglicani (GAGs) sono polisaccaridi lineari costituiti da un numero variabile di unità disaccaridiche ripetitive e rappresentano dei componenti fondamentali della matrice extracellulare e della superficie delle cellule animali. Essi, ad eccezione dell'acido ialuronico, possono presentarsi

covalentemente legati a un “core” proteico per formare proteoglicani. Ogni disaccaride risulta formato da una esosamina (D-galattosamina o D -glucosamina) e un acido uronico (D-glucuronato o o L-iduronato) o da un esoso neutro (D-galattoso) Tra i più importanti si ricordano l’acido ialuronico (HA), il condroitin solfato (CS), il dermatan solfato (DS), l’eparansolfato (HS), l’eparina e il cheratan solfato (KS). L’acido ialuronico è l’unico a non essere solforilato, viene sintetizzato da una sintasi a livello della membrana plasmatica e si ritrova non solo nel tessuto connettivo ma anche in tutti i tessuti e fluidi dell’organismo. I glicosamminoglicani sono coinvolti in una vasta gamma di funzioni biologiche, come la risposta immunitaria oppure la differenziazione, la proliferazione e la migrazione cellulare. Molti studi hanno inoltre evidenziato un ruolo fondamentale di queste molecole nella genesi di parecchi processi patologici, tra cui lo sviluppo tumorale. In questo lavoro ci è sembrato interessante isolare e caratterizzare dal punto di vista biochimico i glicosamminoglicani presenti nel testicolo sano e criptorchide di suino, dal momento che non vi sono dati disponibili in letteratura al riguardo, per evidenziare possibili differenze qualitative o quantitative tra un tessuto sano e un tessuto patologico che potrebbe potenzialmente dare luogo alla formazione di neoplasie.

MATERIALI E METODI

Per questo studio preliminare sono stati utilizzati tre testicoli sani e tre testicoli criptorchidi di suini ibridi commerciali della razza Landrace, appartenenti al tipo pesante (p.v. 150-170 Kg). Gli animali sono stati macellati all’età di nove mesi e i testicoli immediatamente rimossi. Ciascun campione è stato suddiviso in due parti, una per l’esame istologico e l’altra per l’analisi biochimica. Per l’analisi istologica i tessuti normali e patologici sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 5 μ m e colorati con ematossilina-eosina. Per i saggi biochimici i campioni sono stati omogeneizzati, digeriti con papaina e deproteineizzati con acido tricloroacetico. I glicosamminoglicani sono poi stati ottenuti per precipitazione mediante aggiunta di etanolo, seguita da liofilizzazione e solubilizzazione in acqua distillata. L’analisi quantitativa dei GAGs è stata ottenuta con il metodo colorimetrico di Bitter e Muir, utilizzando glucuronolattone come standard, ed espressa come μ g di acido uronico/g di tessuto secco. I GAGs sono poi stati analizzati qualitativamente tramite elettroforesi su lastre di acetato di cellulosa secondo il metodo di Cappelletti et al. e colorate con Alcian blue 8GX, utilizzando come standard condroitin-6-solfato (CC), condroitin-4-solfato (CA), acido ialuronico (HA), eparan solfato (HS) e dermatan solfato (DS), (Sigma, St. Louis, MO, USA). Le bande elettroforetiche sono state analizzate con un densitometro (Apraise Junior Densitometer, Beckman Instruments) e le concentrazioni relative delle singole frazioni dei glicosamminoglicani sono state espresse in percentuale.

RISULTATI

L’esame istologico dei testicoli sani ha evidenziato i tubuli seminiferi contenenti spermatogoni, spermatociti, cellule del Sertoli, spermatidi e spermatozoi; nei testicoli criptorchidi si sono osservate cellule del Sertoli e spermatogoni oltreché numerose cellule interstiziali del Leydig di aspetto ipertrofico (Fig.1).

Per quanto riguarda l’analisi quantitativa effettuata col metodo colorimetrico, non abbiamo evidenziato in via preliminare sui nostri campioni alcuna differenza tra tessuto sano e patologico. Il saggio qualitativo effettuato mediante elettroforesi su acetato di cellulosa (Fig.2) seguito dall’analisi densitometrica (Fig. 3) invece sembra mettere in evidenza nel tessuto criptorchide un minor contenuto percentuale di acido ialuronico e una maggiore presenza di condroitin solfato A rispetto a quello sano .

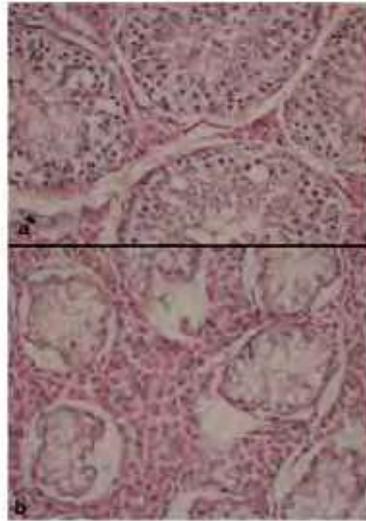


Fig. 1. a. Quadro istopatologico di un testicolo di suino sano: tubuli seminiferi contenenti l'intera linea seminale e scarse cellule di Leydig nell'interstizio. **b.** Testicolo criptorchide: tubuli seminiferi quasi vuoti rivestiti da un solo strato di spermatogoni intercalati a cellule del Sertoli, nell'interstizio notevolmente aumentate ed ipertrofiche le cellule del Leydig. Ematossilina-eosina 200x

Fig.1. a. Hystology of normal testis: seminiferous tubules containing the entire seminal line and few Leydig cells in the interstice. **b.** Cryptorchid testis: seminiferous tubules with empty spaces; spermatogonia with a degenerative pattern are placed in the basal compartment among the Sertoli cells. Interstitial Leydig cells are abundant and hypertrophic. H&E200x

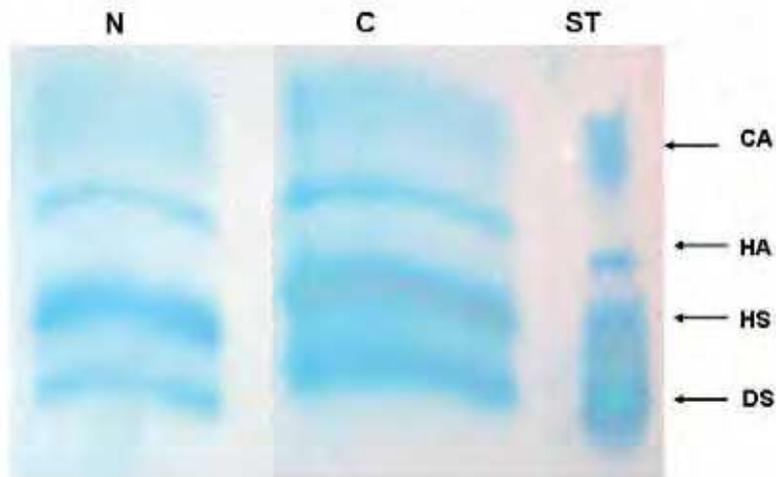


Fig 2. Elettroforesi dei glicosamminoglicani estratti da testicolo normale (N) e criptorchide (C) di suino. ST, standard ; DS: dermatan solfato ; HS: eparan solfato ; HA, acido ialuronico ; CA: condroitin - 4 -solfato

Fig 2. Electrophoresis of glycosamminoglycans extracted from normal (N) and cryptorchid (C) boar testes. ST, standard; DS: dermatan sulfate ; HS: eparan sulfate ; HA:hyaluronic acid, CA: chondroitin 4 sulfate

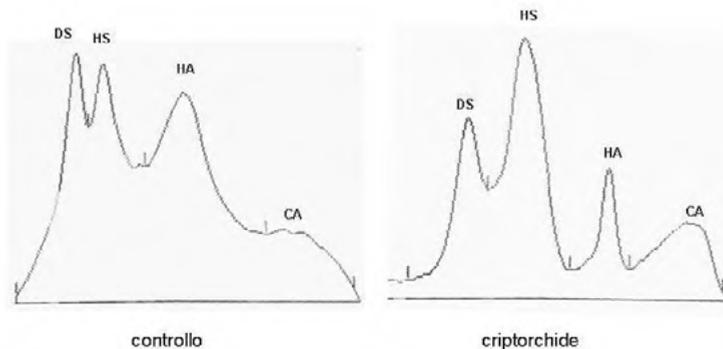


Fig.3 Analisi densitometrica dei glicosaminoglicani estratti dal testicolo sano e criptorchide di suino
 Fig.3 Densitometric analysis of glycosaminoglycans extracted from normal and cryptorchid boar testes

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La morfogenesi dei tessuti e degli organi richiede cambiamenti dinamici a livello di cellule e di componenti della matrice extracellulare, una sostanza gelatinosa che favorisce l'adesione cellulare e contiene canali per la diffusione di sostanze nutrienti e di ossigeno. E' noto dalla letteratura che molte molecole contenute nella matrice extracellulare sono di fondamentale importanza per la differenziazione e la crescita delle gonadi. Nel testicolo adulto la matrice extracellulare rappresenta un importante componente dell'interstizio e partecipa al trasporto di sostanze biologicamente attive necessarie per la comunicazione cellulare e per la regolazione della spermatogenesi e della sintesi ormonale. I proteoglicani e i glicosaminoglicani sono sostanze fondamentali per l'organogenesi e l'assemblaggio della matrice extracellulare e in particolare l'acido ialuronico (o ialuronano), pare sia di fondamentale importanza nel controllare la crescita cellulare e la differenziazione durante lo sviluppo embrionale. A causa della sua elevata polarità e idrofilicità, esso è capace di assorbire e trattenere saldamente grandi quantità d'acqua, espandendo lo spazio extracellulare e creando percorsi ottimali per la migrazione cellulare. Esso è in grado anche di prevenire il danneggiamento delle cellule e dei tessuti da stress fisici, agendo come molecola lubrificante. I livelli di questa sostanza sembrano diminuire con l'invecchiamento. Tra gli altri glicosaminoglicani anche il condroitin solfato ha una funzione lubrificante e conferisce elasticità e resistenza ai tessuti in cui si trova. Diversi studi dimostrano come in presenza di patologie tumorali i livelli di questa sostanza aumentano sensibilmente. Poiché il criptorchidismo rappresenta un problema notevole per quanto riguarda l'apparato genitale maschile nella specie umana e dal momento che il testicolo di suino sembra comparabile a quello dell'uomo per diversi aspetti, nel nostro lavoro abbiamo voluto indagare la presenza di eventuali differenze quali-quantitative riguardanti i glicosaminoglicani tra testicoli sani e testicoli criptorchidi di maiale, data l'importanza di queste molecole nella formazione e nel corretto funzionamento di questi organi. Mentre da un punto di vista quantitativo non abbiamo evidenziato differenze significative nel contenuto di glicosaminoglicani tra i due tipi di tessuto, qualitativamente invece abbiamo potuto riscontrare una diminuzione dei livelli di acido ialuronico e un aumento del condroitinsolfato A nel testicolo patologico rispetto a quello sano. La diminuzione dell'acido ialuronico nel testicolo criptorchide potrebbe essere dovuta al carattere "atrofico" del tessuto, non in grado di produrre spermatozoi maturi, mentre l'aumento del condroitin solfato A fa pensare a una possibile correlazione con la potenziale capacità del tessuto patologico di generare neoplasie. Alla luce di questi risultati quindi riteniamo utile approfondire il nostro studio utilizzando un numero maggiore di campioni.

BIBLIOGRAFIA

- Amann, R.P. and D. N. R. Veeramachaneni (2007) "Cryptorchidism in common eutherian mammals". *Reproduction* 133,541–561.
- Bernal-Mañas C.M., Morales E., Pastor L.M., Pinart E., Bonet S., De la Rosa P., Briz M.D., Zuasti A., Ferrer C. and Canteras M. (2005) "Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism" *Acta Histochem.* 107, 365-372.
- Bitter T. and Muir HM (1962) "A modified uronic acid carbazole reaction". *Analyt. Biochem.* 4, 330-334.
- Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP (1979a) "Rapid multisample separation of the five most widespread animal glycosaminoglycans". *Analyt. Biochem.* 93, 37-40.
- Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP (1979b) "A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run" *Analyt. Biochem.* 99, 311-315.
- Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP (1980) "A new method for characterization on N-sulphate glycosaminoglycans by a rapid and multisample nitrous acid treatment during an electrophoretic run and its application to the analysis of biological samples" *Analyt. Biochem.* 105, 430-435.
- Iozzo RV (1998) "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function". *Annu. Rev. Biochem.* 67, 609-52.
- Iozzo RV (2005) "Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling" *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(8), 646-56.
- Ivell, R., and S. Hartung (2003) "The molecular basis of cryptorchidism". *Mol. Hum. Reprod.* 9, 175–181.
- Miqueloto C.A., Zorn T.M. (2007) "Characterization and distribution of hyaluronan and the proteoglycans decorin, biglycan and perlecan in the developing embryonic mouse gonad". *J Anat.* 211(1):16-25
- Mitropoulou TN and Stagiannis KD (2004) "Variation in sulfation pattern of galactosaminoglycan development of uterine leiomyoma". *Biomed. Chromatogr.* 18, 411-413.
- Mitropoulou TN, Theocharis AD, Stagiannis KD, Karamanos NK (2001) "Identification, quantification and fine structural characterization of glycosaminoglycans from uterine leiomyoma and normal myometrium". *Biochimie.* 83, 529-536.
- Pelliniemi LJ, Paranko J, Grund SK, Fröjdman K, Foidart JM, Lakkala-Paranko T (1984) "Extracellular matrix in testicular differentiation" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 438, 405-16.
- Poole AR (1986) "Proteoglycans in health and disease: structures and functions". *Biochem. J.* 236, 1-14.
- Theocharis AD, Tsara ME, Papageorgakopoulou N, Karavias DD, Theocharis DA (2000) "Pancreatic carcinoma is characterized by elevated content of hyaluronan and chondroitin sulfate with altered disaccharide composition". *Biochim Biophys. Acta* 1815(2), 201-6
- Theocharis AD, Vynios DH., Papageorgakopoulou N, Skandalis SS, Theocharis DA (2003) "Altered content composition and structure of glycosaminoglycans and proteoglycans in gastric carcinoma". *Inter. J. Biochem. Cell. Biol.* 35, 376-390.
- Toole B. (1981) "Glycosaminoglycans in morphogenesis". In: Hay E, editor. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York: Plenum Press pp. 259–289.
- Toole B. (2001) Hyaluronan in morphogenesis. *Cell Dev Biol.* 12,79–87.