



## **Formazione**

### **PATOLOGIA SUINA**

# Analisi biochimica dei glicosaminoglicani (GAGs) nel testicolo sano e criptorchide di suino: studio preliminare

Stefano Amedeo\*, Maria Teresa Capucchio\*, Michele Apicella\*\*\*, Franco Guarda\*,\*\*\*\*, Silvia Mioletti\*\*

\*Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino \*\*Dipartimento di Morfologia Veterinaria, Università degli Studi di Torino

\*\*\*ASL 17/2 Saluzzo, Cuneo

\*\*\*\*Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Patologia Animale, Torino

#### RIASSUNTO

Lo scopo di questo lavoro è stato l'analisi biochimica dei glicosaminoglicani (GAGs) in testicoli normali e criptorchidi di suino per mettere in luce eventuali differenze riguardanti queste molecole nei due tipi di testicolo. Dal punto di vista quantitativo gli autori non hanno rilevato variazioni nel contenuto dei GAGs tra organi normali e patologici, mentre qualitativamente sembra che i testicoli criptorchidi presentino percentualmente un minore contenuto di acido ialuronico (HA) e una maggiore presenza di condroitin solfato A (CSA) rispetto a quelli sani.

**Parole chiave:** criptorchidismo, glicosaminoglicani, suino, testicolo.

#### SUMMARY

**Biochemical analysis of glycosaminoglycans (GAGs) in normal and cryptorchid pig testes: preliminary investigation**

The aim of this work was the biochemical analysis of glycosaminoglycans (GAGs) in normal and cryptorchid pig testes to highlight possible differences between normal and pathological tissues. As preliminary data the authors demonstrated no quantitative differences about GAGs composition between normal and cryptorchid tissues while it seems that qualitatively cryptorchid testes present a lower percentage content of hyaluronic acid (HA) and an increased presence of chondroitin sulfate A (CSA) than healthy organs.

**Keywords:** cryptorchidism, glycosaminoglycans, pig, testis.

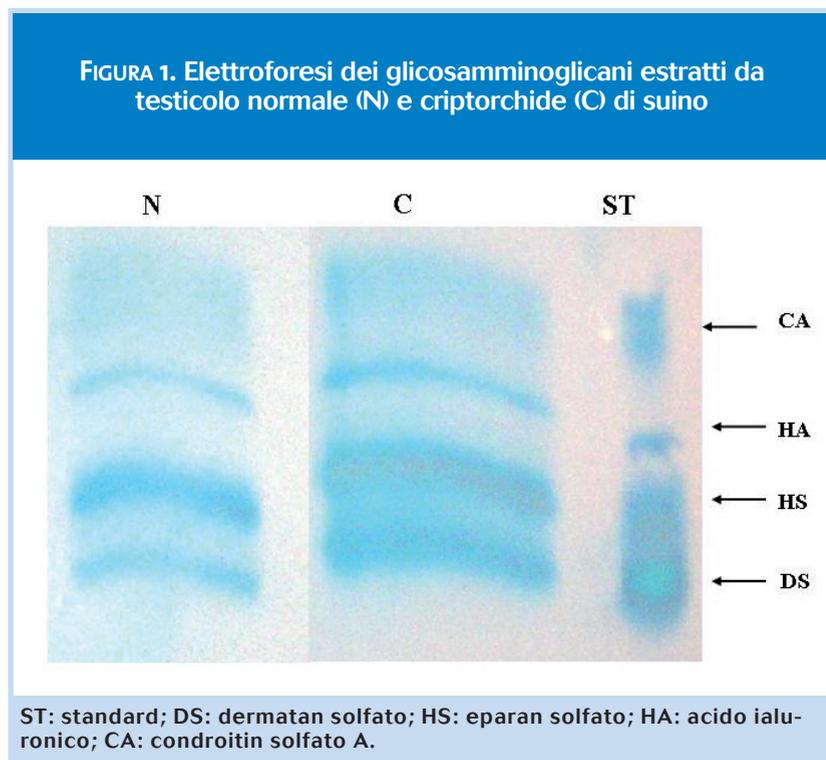
Il criptorchidismo, termine derivato dalle parole greche “kryptos” cioè “nascosto” e “orchis” cioè “testicolo”, rappresenta una patologia che comporta la mancata discesa dei testicoli dall'addome allo scroto, necessaria per consentire una normale spermatogenesi. Secondo Tomiyama *et al.* [24] questa discesa sembra controllata da vari fattori tra i quali la sostanza inibitrice Mülleriana (MIS), l'ormone insulina-3-simile (INSL3) e il testosterone (T). Come già riportato in un precedente lavoro [2], l'eziologia di tale patologia rimane comunque idiopatica, multifattoriale e sembra in parte dovuta a uno squilibrio nel metabolismo degli ormoni steroidei e a un difetto dell'asse ipotalamo-ipofisario [1, 12, 27]. Alcuni autori sostengono che nella genesi del disturbo potrebbero essere coinvolti fattori ambientali, come il contatto con sostanze chimiche (per esempio, ftalati, pesticidi, detergenti) e lo stile di vita [9, 25, 26] oppure una predisposizione genetica [15]. Si è proposto inoltre di inserire il criptorchidismo come parte di una “Sindrome da Disgenesia Testicolare” (TDS), identificata recentemente in medicina umana mediante studi epidemiologici, che comprende anche ipospadia, ridotta qualità dello sperma e cancro testicolare [25].

I glicosaminoglicani (GAGs), un tempo conosciuti come “mucopolisaccaridi” per le loro proprietà viscosose e lubrificanti, sono polisaccaridi lineari costituiti da un numero variabile di unità disaccaridiche

ripetitive nelle quali ogni disaccaride è formato da una esosamina (D-galattosamina o D-glucosamina) e un acido uronico (D-glucuronato o L-iduronato) o da un esoso neutro (D-galattoso). Tra i più importanti si annoverano 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; è sintetizzato da una *sintasi* a livello della membrana plasmatica e si ritrova sia nel tessuto connettivo che in tutti i tessuti e fluidi dell'organismo [11]. I GAGs sono sostanze fondamentali della matrice extracellulare e della superficie delle cellule animali; alcuni di essi sono in grado di legarsi a una serie di proteine distinte, coinvolte in processi fisiologici e patologici, comprese chemochine, citochine, fattori di crescita, morfogeni, enzimi e molecole di adesione [16]. Queste molecole svolgono una funzione molto importante nella trasmissione di segnali intracellulari e nello sviluppo cellulare, nell'angiogenesi, nella crescita assonale, nella formazione di tumori e metastasi e come anti-coagulanti [8, 13, 14, 21, 23]. Il ruolo fondamentale che queste molecole rivestono nella proliferazione cellulare sembra dovuto al fatto che esse possono agire come co-recettori per fattori di crescita della famiglia del “Fattore di Crescita dei Fibroblasti” (FGF) e la sovraespressione di questi ultimi potrebbe contribuire alla progressione tumorale [14].



## **Formazione**



Il riscontro di testicoli criptorchidi in suini in corso di macellazione e le modificazioni istologiche riportate in letteratura nei testicoli criptorchidi di suino [10], e il fatto che per diversi aspetti il testicolo del suino è simile a quello dell'uomo [19, 20], hanno indotto gli autori ad approfondire gli studi su questa patologia e in particolare a indagare dal punto di vista biochimico sul contenuto di glicosaminoglicani isolati in testicoli sani e criptorchidi monolaterali di suino, per evidenziare possibili differenze qualitative o quantitative riguardo a tali molecole tra un testicolo sano e uno patologico che, come ben documentato in medicina umana [25, 26, 27], 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 monolaterali 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 prelevati. 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 µm e colorati con ematossilina-eosina. Per i saggi biochimici, i campioni sono stati omogeneizzati, digeriti con papaina e deproteneizzati con acido tricloroacetico. I glicosaminoglicani sono poi stati ottenuti per precipitazione mediante aggiunta di etanolo, seguita da liofilizzazione e solubilizzazione in acqua distillata [7]. L'analisi quantitativa dei GAGs è stata ottenuta con il metodo colorimetrico di Bitter e Muir [4], utilizzando glucuronolattone come standard, ed espressa come µg 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.* [5, 6] 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 glicosaminoglicani sono state espresse in percentuale.

### Risultati

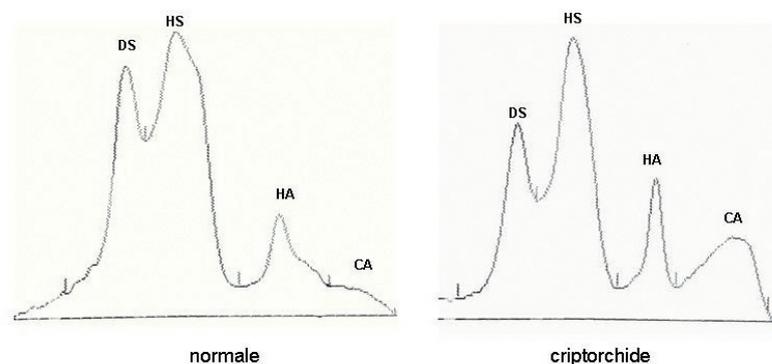
L'esame istologico dei testicoli sani ha evidenziato i tubuli seminiferi contenenti spermatogoni, spermatociti, cellule del Sertoli, spermatidi e spermatozoi; nei testicoli criptorchidi si sono osservate cellule del Sertoli, spermatogoni e numerose cellule interstiziali del Leydig di aspetto ipertrofico. In via preliminare per quanto riguarda l'analisi quantitativa effettuata col metodo colorimetrico, gli autori non hanno rilevato alcuna differenza tra tessuto sano e patologico. Il saggio qualitativo, effettuato mediante elettroforesi su acetato di cellulosa (figura 1), seguito dall'analisi densitometrica (figura 2) invece sembra dimostrare nel tessuto criptorchide un minor contenuto percentuale di acido ialuronico e una maggiore presenza di condroitin solfato A rispetto a quello sano (figura 3).

### Considerazioni e conclusioni

Nei mammiferi lo sviluppo delle gonadi e la differenziazione sessuale sono processi molto complessi che richiedono l'e-

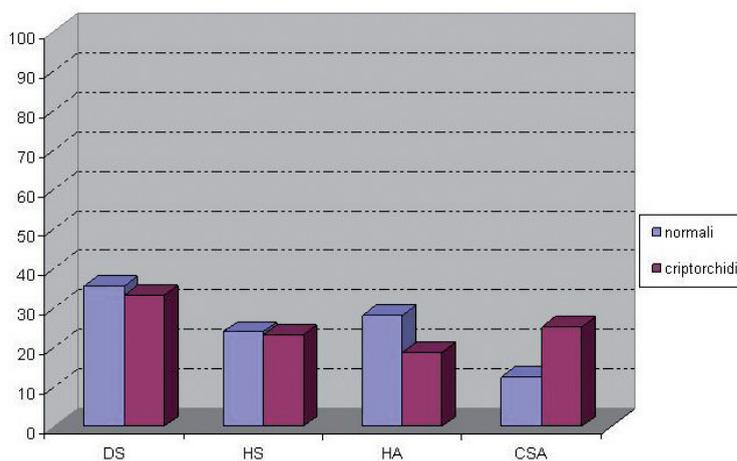
spressione coordinata di geni specifici durante un ristretto spazio temporale; è noto inoltre che la matrice extracellulare (ECM) gioca un ruolo molto importante nella differenziazione e nella crescita delle gonadi. Nel testicolo adulto, infatti, l'ECM è un importante componente dell'interstizio e partecipa al trasporto di sostanze biologicamente attive necessarie per la comunicazione cellulare e per la regolazione della spermatogenesi e della sintesi ormonale [18]. A questo proposito i glicosaminoglicani sono sostanze fondamentali per l'organogenesi e l'assemblaggio dell'ECM; in particolare l'acido ialuronico (HA) riveste numerosi importanti ruoli funzionali essendo coinvolto, grazie alle sue singolari proprietà idrodinamiche, nella morfogenesi embrionale, nelle malattie polmonari e vascolari, nella guarigione delle ferite, oltre che nella lubrificazione delle articolazioni e nella protezione delle superfici cartilaginee [11]. Questa sostanza è in grado anche di prevenire il danneggiamento delle cellule e dei tessuti causato da stress fisici, agendo come molecola lubrificante, e i suoi livelli sembrano diminuire con l'invecchiamento [14]. La sintesi di collagene, glicosaminoglicani, e in particolare di HA, sembra essere fondamentale per la dinamica testicolare, in particolare per ciò che riguarda il metabolismo degli ormoni steroidei e dei fattori di crescita, come anche nel primo stadio di formazione del *gubernaculum testis*, tessuto connettivo lasso di estrema importanza meccanica per la migrazione trans addominale (discesa) del testicolo. Le caratteristiche dell'ECM sono importanti nel mantenimento di strutture cellulari separate e mobili che impediscano l'aggregazione, l'adesione e la differenziazione prematura del tessuto, e sembra che l'HA possa contribuire alla crescita delle gonadi all'interno dell'interstizio [17]. Tra gli altri glicosaminoglicani anche il condroitin solfato ha una funzione lubrificante e conferisce elasticità e resistenza ai tessuti in cui si trova. È dimostrato in letteratura che, in presenza di patologie tumorali, i livelli di questa sostanza aumentano sensibilmente [3]. Poiché il criptorchidismo rappresenta un problema notevole per quanto riguarda l'apparato genitale maschile nella specie umana e, inoltre, il testicolo di suino sembra comparabile a quello dell'uomo per diversi aspetti [19, 20], nel nostro lavoro abbiamo voluto indagare la presenza di eventuali differenze quali-quantitative riguardanti i glicosaminoglicani tra testicoli sani e testicoli criptorchidi di

**FIGURA 2.** Analisi densitometrica dei glicosaminoglicani estratti da testicolo sano e criptorchide di suino



DS: dermatan solfato; HS: eparan solfato; HA: acido ialuronico; CA: condroitin solfato A.

**FIGURA 3.** Rappresentazione delle frazioni percentuali dei GAGs ottenuta mediante l'analisi densitometrica in testicoli normali e criptorchidi di suino



DS: dermatan solfato; HS: eparan solfato; HA: acido ialuronico; CA: condroitin solfato A.

maiale, data l'importanza di queste molecole nella formazione e nel corretto funzionamento di questi organi. Mentre da un punto di vista quantitativo gli autori non hanno evidenziato differenze rilevanti nel contenuto di glicosaminoglicani tra i due tipi di tessuto, qualitativamente invece si sono riscontrati una diminuzione dei livelli di acido ialuronico e un aumento del condroitin solfato A nel testicolo criptorchide rispetto a quello sano. La diminuzione dell'acido ialuronico nel testicolo criptorchide potrebbe essere dovuta al carat-



# Formazione

tere "involutivo" del tessuto, non in grado di produrre spermatozoi maturi, e giustificerebbe in parte la diminuzione della viscoelasticità, le difettose interazioni intercellulari e tra cellula e matrice extracellulare a livello dell'interstizio oltre all'alterata regolazione endocrina e auto-crina delle cellule di Leydig osservate nei testicoli criptorchidi, come documentato in letteratura [20]. L'aumento del condroitin solfato A farebbe invece pensare a una possibile correlazione con la potenziale capacità del tessuto criptorchide di

generare neoplasie, come riportato da numerosi autori nell'uomo [25, 26, 27], ma non ancora dimostrato nel suino, forse anche per la giovane età dei soggetti macellati. Nonostante si tratti di uno studio preliminare, sulla base di questi risultati gli autori ritengono utile un approfondimento della loro ricerca, allo scopo di migliorare le conoscenze sui fattori che possono influenzare la produzione della matrice extracellulare e prevenire in qualche modo la trasformazione neoplastica delle cellule testicolari in età adulta. ■

## Bibliografia

- 1-Amann R.P., Veeramachaneni D.N.R. Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction*. 2007; vol. 133: pp. 541-561.
- 2-Amedeo S., Cerruti F., Capucchio M.T., De Maria R., Apicella R., Giberti M., Guarda F., Mioletti S. Attività ed espressione dell'enzima 3-beta-idrossisteroide deidrogenasi in testicoli sani e criptorchidi di suino. *Summa Animalia da Reddito*. 2009; vol. 8: pp. 27-30.
- 3-Asimakopoulou AP, Theocharis A, Tzanakakis GN, Karamanos NK. The biological role of chondroitin sulfate in cancer and chondroitin-based anticancer agents. *In Vivo*. 2008; vol. 22, n. 3: pp. 385-9.
- 4-Bitter T. and Muir HM A modified uronic acid carbazole reaction. *Analyt. Biochem.* 1962; vol. 4: pp. 330-334.
- 5-Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP Rapid multisample separation of the five most widespread animal glycosaminoglycans. *Analyt. Biochem.* 1979a; vol. 93: pp. 37-40.
- 6-Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run. *Analyt. Biochem.* 1979b; vol. 99: pp. 311-315.
- 7-Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP. 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.* 1980; vol. 105: pp. 430-435.
- 8-Casu B., Guerrini M., Torri G. Structural and conformational aspects of the anticoagulant and anti-thrombotic activity of heparin and dermatan sulfate. *Curr Pharm Des.* 2004; vol. 10: pp. 939-949.
- 9-Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr. Rev.* 2008; vol. 29, n. 5: pp. 560-80.
- 10-Gambino F., Giberti M., Apicella M., Druetta P., Amedeo S., Dore B., Iussich S., Guarda F. Osservazioni al macello sulla patologia testicolare nei suini con particolare riferimento ai criptorchidi. *Large Anim. Rev.* 2003; vol. 9, n. 5: pp. 49-55.
- 11-Gandhi NS, Mancera R. L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des.* 2008; vol. 72: pp. 455-82.
- 12-Hejmej A., Bili ska B. The effects of cryptorchidism on the regulation of steroidogenesis and gap junctional communication in equine testes. *Endokrynol. Pol.* 2008; vol. 59, n. 2: pp. 112-8.
- 13-Holt C.E., Dickson B.J. Sugar codes for axons? *Neuron*. 2005; vol. 46: pp. 169-172.
- 14-Iozzo R.V., San Antonio J.D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest.* 2001; vol. 108: pp. 349-355.
- 15-Ivell R., Hartung S. The molecular basis of cryptorchidism. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; vol. 9: pp. 175-181.
- 16-Jackson R.L., Busch S.J., Cardin A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev.* 1991; vol. 71: pp. 481-539.
- 17-Miqueloto C.A., Zorn T.M. Characterization and distribution of hyaluronan and the proteoglycans decorin, biglycan and perlecan in the developing embryonic mouse gonad. *Journal of Andrology.* 2007; vol. 211, n. 1: pp. 16-25. <http://jas.fass.org/cgi/ijlink?linkType=FULL&journalCode=jandrol&resid=24/2/155>
- 18-Pelliniemi L.J., Paranko J., Grund SK, Fröjdman K, Foidart JM, Lakkala-Paranko T. Extracellular matrix in testicular differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1984; vol. 438: pp. 405-16.
- 19-Pinart E, Sancho S, Briz M, Bonet S. Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *J Morphol.* 1999; vol. 239: pp. 225-43.
- 20-Pinart E., Sancho S., Briz M., Bonet S., Garcia N., Badia E. Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *Journal Morphol.* 2000; vol. 244: pp. 190-202.
- 21-Sanderson R. D. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; vol. 12: pp. 89-98.
- 22-Sasisekharan R., Shriver Z., Venkataraman G., Narayanasami U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; vol. 2: pp. 521-528.
- 23-Timar J., Lapis K., Dudas J., Sebestyen A., Kopper L., Kovalszky I. Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2002; vol. 12: pp. 173-18.
- 24-Tomiyama H, Sasaki Y, Huynh J, Yong E, Ting ad and Hutson JM. Testicular descent, cryptorchidism and inguinal hernia: the Melbourne perspective. *Journal Pediatr Urol.* 2005; vol. 1: pp. 11-25.
- 25-Virtanen HE, Bierknes R, Cortes D, Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main K. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr.* 2007; vol. 96: pp. 611-616.
- 26-Virtanen HE, Toppari J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Hum Reprod Update.* 2008; vol. 14, n. 1: pp. 49-58.
- 27-Winter C, Albers P. Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; vol. 7, n. 1: pp. 43-53.