

***Università degli Studi di Firenze***

**Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale**

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE E  
TECNOLOGIE BIOMOLECOLARI E  
MORFOLOGICHE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA E**

**MORFOGENESI UMANA**

**XXI Ciclo**

**Settore Disciplinare BIO/16**

**“I SIALODERIVATI NEL CORSO  
DELL’INVECCHIAMENTO IN ALCUNI  
ORGANI NELL’APPARATO GENITALE  
UMANO”**

**Dott.ssa Debora Vichi**

**Coordinatore**

**Prof. Paolo Pacini**

**Tutor**

**Prof. Gherardo Gheri**

## Indice

1. INTRODUZIONE	pag. 9
1.1. Modificazioni morfologiche dell'ovidotto durante l'invecchiamento	pag.12
1.2. Modificazioni morfologiche del testicolo durante l'invecchiamento	pag.13
2. MATERIALI E METODI	pag.15
2.1. Raccolta dei campioni	pag.15
2.2. Istochimica delle lectine	pag.18
2.2.1. Marcatura con lectine	pag.18
2.2.2. Trattamenti chimici ed enzimatici	pag.20
2.2.3. Controlli	pag.22
2.2.4. Valutazione della reattività	pag.23
2.2.5. Analisi statistica	pag.25
3. RISULTATI	pag.26
3.1. Localizzazione della reattività delle lectine MAA ed SNA	pag.26
<u>Testicolo</u>	
3.1.1. Cellule dei tubuli seminiferi	pag.26
3.1.2. Tessuto interstiziale, lamina propria, cellule di Leydig e cellule endoteliali	

dei vasi	pag.26
<u>Ovidotto</u>	
3.1.3. Cellule epiteliali	pag.27
3.1.4. Lamina propria	pag.28
3.1.5. Endotelio	pag.29
3.2.Localizzazione della reattività con PNA con e senza trattamenti chimici ed enzimatici	pag.31
<u>Testicolo</u>	
3.2.1. Cellule dei tubuli seminiferi	pag.31
3.2.2. Tessuto interstiziale, lamina propria, cellule di Leydig e cellule endoteliali	pag.32
<u>Ovidotto</u>	
3.2.3. Cellule epiteliali	pag.34
3.2.4. Lamina propria	pag.40
3.2.5. Cellule endoteliali	pag.44
3.3.Analisi statistica dell'intensità di reattività delle lectine	pag.48
<u>Testicolo</u>	
3.3.1. Differenze dell'intensità di reattività della PNA, con o senza trattamenti, in ogni gruppo	pag.48

3.3.2. Differenze di intensità di reattività delle lectine tra i due gruppi di studio	pag.51
<u>Ovidotto</u>	
3.3.3. Differenze dell'intensità di reattività della PNA, con o senza trattamenti, in ogni gruppo	pag.53
3.3.4. Differenze tra reattività della PNA dopo trattamento di deacetilazione-neuraminidasi e reattività di MAA ed SNA	pag.55
3.3.5. Differenze di reattività delle lectine tra le donne fertili (gruppo 1B)	pag.56
3.3.6. Differenze di reattività delle lectine tra le donne in postmenopausa (gruppo 2B)	pag.56
3.3.7. Differenze di reattività delle lectine tra i due gruppi di studio (donne fertili ed in postmenopausa)	pag.58
3.4. Controlli	pag.60
4. DISCUSSIONE	pag.70
<u>Conclusioni</u>	pag.85

## 5. BIBLIOGRAFIA

pag.88

## Indice delle tabelle

- Tabella 1- Profilo clinico delle pazienti e del tratto oviduttale esaminato pag.17
- Tabella 2- Localizzazione della reattività delle lectine MAA ed SNA nel tessuto interstiziale e nella lamina propria del testicolo pag.27
- Tabella 3- Localizzazione della reattività delle Lectine MAA ed SNA nell'ovidotto pag.30
- Tabella 4- Localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule dei tubuli seminiferi del testicolo pag.32
- Tabella 5- Localizzazione della reattività della lectina PNA nella lamina propria, nelle cellule di Leydig e nell'endotelio dei vasi sanguigni pag.34
- Tabella 6- Donne fertili (gruppo 1B): localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule epiteliali oviduttali pag.36
- Tabella 7- Donne in postmenopausa (gruppo 2B): localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule epiteliali oviduttali pag.39

- Tabella 8- Donne fertili (gruppo 1B):  
 localizzazione della reattività della lectina PNA  
 nella lamina propria oviduttale pag.42
- Tabella 9- Donne in postmenopausa (gruppo  
 2B): localizzazione della reattività della lectina  
 PNA nella lamina propria oviduttale pag.43
- Tabella 10- Donne fertili (gruppo 1B):  
 localizzazione della reattività della lectina PNA  
 nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni  
 oviduttali pag.46
- Tabella 11- Donne in postmenopausa (gruppo  
 2B): localizzazione della reattività della lectina  
 PNA nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni  
 oviduttali pag.47

## *Indice delle figure*

• Figura 1	pag.61
• Figura 2	pag.61
• Figura 3	pag.62
• Figura 4	pag.62
• Figura 5	pag.63
• Figura 6	pag.63
• Figura 7	pag.64
• Figura 8	pag.64
• Figura 9	pag.65
• Figura 10	pag.65
• Figura 11	pag.66
• Figura 12	pag.66
• Figura 13	pag.67
• Figura 14	pag.67
• Figura 15	pag.68
• Figura 16	pag.68
• Figura 17	pag.69



## 1.INTRODUZIONE

Gli acidi sialici sono rappresentati da una famiglia di nove zuccheri carbossilati che si trovano frequentemente come unità terminali nelle catene oligosaccaridiche dei glicoconiugati. Questi zuccheri conferiscono cariche negative alla superficie cellulare e sono responsabili, come ligandi specifici, dei fenomeni di riconoscimento intercellulare e/o intermolecolare<sup>1</sup>. Acidi sialici con diversa struttura, presentano proprietà diverse<sup>2,3</sup> a causa dell'aggiunta di uno o più esteri O-acetilici ai gruppi ossidrilici<sup>4</sup> e per la diversa configurazione del legame al penultimo zucchero, che può essere  $\alpha$  2-3,  $\alpha$  2-6 e  $\alpha$  2-8.

L'istochimica delle lectine è un utile strumento per lo studio dell'acido sialico, per la cui caratterizzazione sono state sviluppate due metodiche. Nella prima, diretta, lectine biotinilate o coniugate a digoxigenina, come *Maackia amurensis* II (MAL II o MAA) e *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), sono state usate per

identificare i legami dell'acido sialico, che sono rispettivamente,  $\alpha$  2-3 e  $\alpha$  2-6 al galattosio o alla galattosamina<sup>1,5-7</sup>. Per quanto riguarda la seconda metodica, indiretta, è stata utilizzata la lectina PNA coniugata a perossidasi (HRP) o a digoxigenina (DIG), in combinazione con trattamenti enzimatici (digestione con sialidasi) e chimici (ossidazione differenziale a diversa concentrazione e deacetilazione), allo scopo di studiare l'espressione dell'acido sialico legato al D-Galattosio( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)-N-acetil-D-Galattosamina (Sia-D-Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)-D-GalNAc) e la sua struttura<sup>1,7</sup>.

In letteratura sono presenti numerosi studi riguardo alla distribuzione ed al ruolo di vari residui zuccherini dei glicoconiugati in organi degli apparati genitali maschile e femminile umani implicati nel processo di fecondazione, quali il testicolo<sup>8-12</sup> e l'ovidotto<sup>2,13-15</sup>. Per quanto riguarda la presenza di sialoderivati a livello delle tube uterine, sono disponibili diversi dati derivanti da studi su mammiferi, come ad

esempio sul coniglio<sup>1</sup>, sul criceto<sup>16</sup> e sul ratto<sup>17</sup>, da cui emerge che questi zuccheri potrebbero avere un ruolo fondamentale nell'adesione degli spermatozoi all'epitelio oviduttale ed alla loro capacitazione. Tuttavia i dati riguardanti l'acido sialico e la sua caratterizzazione nell'ovidotto e nel testicolo umano sono scarsi<sup>8,11,18</sup>.

Lo scopo di questa tesi quindi, è stato quello di ottenere una caratterizzazione completa di vari tipi di sialoderivati, mediante le diverse suddette metodiche, e studiare la loro distribuzione sia nel testicolo di uomini in diverse età della vita, che nell'ovidotto di donne fertili, in varie fasi del ciclo ormonale, ed in postmenopausa, al fine di valutare il loro possibile ruolo nella funzionalità di entrambi gli organi durante l'invecchiamento.

### **1.1-Modificazioni morfologiche dell'ovidotto durante l'invecchiamento**

Sulla base di osservazioni effettuate al microscopio ottico, sia nell'ambito di questo studio che in precedenti lavori<sup>15</sup>, è stato possibile osservare che l'epitelio della porzione ampollare e di quella istmica dell'ovidotto delle donne in postmenopausa, mostra una diminuzione del numero delle cellule ciliate rispetto alle donne fertili. Tali cellule spesso appaiono raggruppate in clusters e in alcuni casi non presentano ciglia. Hafez<sup>19</sup>, utilizzando la microscopia elettronica, osservò anche una piccola attività secretoria nell'epitelio oviduttale delle donne in postmenopausa.

## **1.2-Modificazioni morfologiche del testicolo durante l'invecchiamento**

In base ad osservazioni morfologiche effettuate sia al microscopio ottico che elettronico, sono state individuate numerose modificazioni a livello delle componenti testicolari durante l'invecchiamento.

Sebbene non sia possibile definire un'età precisa con cui far coincidere l'inizio dell'involutione testicolare, la qualità dello sperma, la quantità delle cellule germinali e la dimensione dei testicoli (il volume occupato dai tubuli seminiferi diminuisce, mentre quello occupato dal tessuto interstiziale rimane costante) diminuiscono con il progredire dell'età. Il quadro istologico delle variazioni dovute all'invecchiamento è vario e va da testicoli con spermatogenesi completa, sebbene ridotta, alla completa sclerosi dei tubuli. I tubuli con spermatogenesi completa, possono mostrare numerose

variazioni morfologiche a livello delle cellule germinali, come ad esempio cellule di Sertoli multinucleate. Le cellule anomale in degenerazione vengono fagocitate dalle cellule di Sertoli, causando la formazione di vacuoli e l'accumulo di gocce lipidiche nel loro citoplasma<sup>20</sup>. La spermatogenesi è bloccata a diversi livelli (spermatidi, spermatociti, spermatogoni)<sup>21</sup> e si ha il rilascio di cellule germinali immature<sup>22</sup>. La diminuzione delle cellule germinali è associata all'ispessimento della lamina propria dei tubuli seminiferi. Quando rimane soltanto una lamina propria intensamente collagenizzata, si parla di tubuli sclerotici<sup>20</sup>.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Raccolta dei campioni**

#### **•*Testicolo***

Sono stati utilizzati 10 campioni ottenuti da orchidectomia di uomini di età compresa tra i 18 ed i 30 anni (gruppo 1A) e 15 campioni autoptici di uomini di età compresa tra i 70 ed i 93 anni (gruppo 2A). Sia i pazienti del gruppo 1A che quelli del gruppo 2A, non presentavano patologie della riproduzione, endocrine o malattie ad esse correlate nel testicolo. I campioni sono stati raccolti 5-6 ore dopo il decesso. Per poter valutare cambiamenti post-mortem nei campioni autoptici, sono stati raccolti anche due campioni provenienti da pazienti affetti da tumore testicolare.

- ***Ovidotto***

Sono stati prelevati alcuni frammenti dell'endometrio e dell'ovidotto (porzione ampollare ed in alcuni casi anche istmica) da nove donne fertili sottoposte ad isterectomia a causa di una patologia di natura benigna (gruppo 1B). Sulla base dell'andamento del ciclo mestruale e dell'istologia dell'endometrio, è stato accertato che al momento del prelievo, quattro delle pazienti erano in fase proliferativa e cinque in fase secretiva (Tabella 1). Sono stati inoltre prelevati campioni di endometrio e tube da dieci donne in postmenopausa di età compresa tra i 48 ed i 75 anni, sottoposte ad isterectomia vaginale in seguito ad una diagnosi di prolasso dell'utero (gruppo 2B). Nessuna di queste donne era affetta da diabete o ipertensione e negli ultimi cinque anni nessuna era stata sottoposta a terapia ormonale. Tutte le pazienti hanno dato il loro consenso informato.



**Tabella 1-Profilo clinico delle pazienti e del tratto oviduttale esaminato**

Biopsia n°	Porzione esaminata	Età	Fasi dell'endometrio
<i>Donne Fertili (gruppo 1B)</i>			
02/17335	A	42	Proliferativa precoce
03/17850	A & I	40	Proliferativa precoce
99/17822	A & I	45	Proliferativa media
03/21850	A & I	48	Proliferativa tardiva
02/27822	A & I	41	Secretiva precoce
97/19913	A	52	Secretiva media
03/24111	A & I	53	Secretiva media
02/ 27824	A & I	44	Secretiva tardiva
97/21298	A	59	Secretiva tardiva
<i>Donne in postmenopausa (gruppo 2B)</i>			
97/16677	A	48	1 anno
97/21945	A	52	1 anno
97/21661	A & I	57	5 anni
97/19216	A & I	57	4 mesi
97/16060	I	59	5 anni
97/21299	I	62	9 anni
97/16355	A & I	63	23 anni
97/16866	A & I	63	14 anni
97/17091	A & I	68	24 anni
97/13074	A & I	75	23 anni

A: porzione ampollare; I: porzione istmica.

Immediatamente dopo il prelievo, tutti i campioni, sia di testicolo che di ovidotto, sono stati fissati in liquido di Carnoy e inclusi in paraffina.

Sono state eseguite sezioni di 5 µm di spessore da ogni campione ed alcune di esse sono state colorate con Ematossilina-Eosina, per osservazioni morfologiche generali del tessuto.

## **2.2 Istochimica delle lectine**

### **2.2.1 Marcatura con lectine**

Sono state usate le lectine MAA, SNA e PNA coniugate a digoxigenina<sup>23</sup>.

Dopo l'idratazione, le sezioni sono state trattate con Blocking Reagent al 10% in Tris Buffered Saline (TBS, Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15M, pH 7.5) per 30 minuti, lavate due volte in TBS per 10 minuti e sciacquate in Buffer 1 (MgCl<sub>2</sub> 1mM, MnCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM in TBS, pH7.5) per 10 minuti. Le sezioni sono poi state incubate per un'ora a temperatura ambiente con le lectine coniugate a digoxigenina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) diluite in Buffer 1. Le

concentrazioni ottimali per ciascuna lectina, che consentivano la massima colorazione con il minimo colore di fondo, erano le seguenti:

- PNA (*Arachis Hypogaea*, legame specifico con D-Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)-D-GalNAc): 10 $\mu$ l/1ml
- SNA (*Sambucus Nigra*, legame specifico con Neu5Ac( $\alpha$ -2 $\rightarrow$ 6)Gal/GalNAc): 1 $\mu$ l/1ml
- MAA (*Maackia Amurensis*, legame specifico con Neu5Ac( $\alpha$ -2 $\rightarrow$ 3)Gal): 5 $\mu$ l/1ml

Le sezioni sono state sciacquate tre volte con TBS per 10 minuti, incubate con antidigoxigenina diluita in TBS (1 $\mu$ l/1ml) per un'ora e nuovamente lavate per tre volte in TBS per 10 minuti. La colorazione dei siti che contengono la lectina legata a digoxigenina è stata ottenuta tramite incubazione delle sezioni con NBT/X-fosfato (20 $\mu$ l/1ml) diluito in Buffer 2 (Tris-HCl 0.1M, MgCl<sub>2</sub> 0.05M, NaCl 0.1M, pH 9.5) per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati infine sciacquati in acqua distillata, disidratati con soluzioni

crescenti di etanolo, diafanizzati in xilene e quindi montati in Permout.

### 2.2.2 Trattamenti chimici ed enzimatici

In alcuni esperimenti è stato rimosso l'acido sialico pretrattando le sezioni per 18 ore a 37°C con una soluzione di tampone sodio acetato 0.25M (5,5mM CaCl<sub>2</sub>, 154mM NaCl, pH 5.5), contenente 0.1 unità/ml di sialidasi (neuraminidasi Tipo X da *Clostridium perfringens* (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO)), prima dell'incubazione con PNA coniugata a digoxigenina. In alcuni casi, prima della digestione con sialidasi, è stato effettuato il trattamento di deacetilazione, incubando le sezioni per 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di KOH allo 0,1% in etanolo al 70%. Questo trattamento, rimuovendo i sostituenti acetilati, rende suscettibili alla digestione con neuraminidasi i residui dell'acido sialico

che contengono gruppi acetilici su C<sub>4</sub> dell'anello piranosidico<sup>24</sup>.

Per quanto riguarda il trattamento di ossidazione differenziale, sono state utilizzate due soluzioni acquose a diversa concentrazione di acido periodico:

- 1mM per l'ossidazione differenziale moderata
- 44mM per l'ossidazione differenziale forte

In entrambi i casi le sezioni sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente. L'ossidazione differenziale moderata elimina la colorazione delle sezioni trattate con sialidasi/PNA o deacetilazione/sialidasi/PNA se l'acido sialico non contiene gruppi acetilici nella catena laterale legati con legame O-glicosidico in C<sub>7</sub>-e/o C<sub>8</sub>- e/o C<sub>9</sub>. L'ossidazione differenziale forte invece, blocca la colorazione con sialidasi/PNA o deacetilazione/sialidasi/PNA se non è presente acido sialico acetilato in C<sub>9</sub> legato  $\alpha$  2-3 al penultimo  $\beta$ -galattosio<sup>25</sup>.

### 2.2.3 Controlli

Sono stati effettuati controlli per la specificità delle lectine, sostituendo le lectine coniugate a digoxigenina con lectine non coniugate oppure preincubando le lectine con i corrispondenti zuccheri (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO), specifici per ognuna di esse:

- $\alpha$  2-3 sialillattosio 0.1 M per MAA
- $\alpha$  2-6 sialillattosio 0.1 M per SNA
- D-galattosio 0.2 M per PNA

Il controllo per la digestione con neuraminidasi è stato effettuato incubando le sezioni con il solo tampone sodio acetato, privo dell'enzima<sup>26</sup>. L'efficacia della digestione è stata valutata trattando sezioni adiacenti, sottoposte o meno a deacetilazione, con la soluzione contenente l'enzima e quindi incubandole con MAA ed SNA<sup>1</sup>. Alcune sezioni di controllo sono state sottoposte a desolfatazione, cioè trattate con acido cloridrico 0,15N in metanolo per 5 ore a 60°C e quindi

incubate con una soluzione di KOH in etanolo al 70% per 15 minuti a temperatura ambiente<sup>27</sup>.

Tutte le sezioni sono state colorate contemporaneamente, per ogni lectina, in modo da eliminare variazioni correlate ad occasionali differenze che possono manifestarsi in tempi diversi.

#### 2.2.4 Valutazione della reattività

Per valutare la localizzazione della reattività, è stata utilizzata una griglia di 1mm x 1mm, divisa in 100 campi. Sono stati esaminati venti campi selezionati in modo casuale, per ogni sezione (5 sezioni per ogni campione). Per ciascun campo è stata valutata la localizzazione della reattività nelle seguenti componenti testicolari: cellule del Sertoli, cellule germinali, cellule di Leydig, lamina propria dei tubuli seminiferi, tessuto interstiziale e cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Con

la stessa modalità, sono state esaminate le seguenti componenti oviduttali: cellule epiteliali secernenti, cellule epiteliali ciliate, lamina propria e cellule endoteliali dei vasi sanguigni.

In ogni campo di ciascuna sezione esaminata per la localizzazione della reattività, è stata anche fatta un'analisi quantitativa per valutare l'intensità di reazione nelle varie componenti sia testicolari, che oviduttali. A questo scopo la densità ottica è stata misurata utilizzando un programma per l'analisi delle immagini computerizzato (Image-Pro Plus v. 4.5, Media Cybernetics). L'intensità di colorazione è stata misurata ed espressa in unità arbitrarie standardizzate da 0 a 250, considerando 0 il massimo della colorazione e 250 l'assenza di colorazione. Sono state ripetute cinque misurazioni per ogni campo.



### 2.2.5 Analisi Statistica

Per confrontare i dati delle componenti reattive ottenuti con l'analisi densiometrica, è stato utilizzato il *t*-test per campioni appaiati. Sono state valutate le seguenti differenze:

- 1.** differenze nell'intensità di reattività della PNA con o senza trattamenti, in campioni dello stesso gruppo
- 2.** differenze nell'intensità di reattività delle lectine tra campioni dei due gruppi di studio.

Una probabilità inferiore al 5% ( $P < 0.05$ ) è stata considerata statisticamente significativa.

La riproducibilità delle misurazioni è stata accertata confrontando i risultati di un osservatore in tempi diversi e tra due osservatori. Il coefficiente di variabilità di ogni singolo osservatore è stato dell'1.5%, mentre quello tra osservatori diversi è stato del 5.2%.

## **3 RISULTATI**

### **3.1. Localizzazione della reattività delle lectine MAA ed SNA**

- ***Testicolo***

#### **3.1.1. Cellule dei tubuli seminiferi**

Non è stata osservata nessuna reattività con MAA ed SNA in nessun elemento dei tubuli seminiferi di tutti gli uomini dei due gruppi di studio.

#### **3.1.2 Tessuto interstiziale, lamina propria, cellule di Leydig e cellule endoteliali dei vasi (Tabella 2)**

Non è stata osservata nessuna reattività con MAA ed SNA in nessun componente della maggior parte dei pazienti del gruppo 1A. Nel gruppo 2A, la lamina propria ed il tessuto interstiziale di tutti i soggetti

mostravano reattività con le lectine MAA ed SNA (Fig. 1 e 2).

***Tabella 2-Localizzazione della reattività delle lectine MAA ed SNA nel tessuto interstiziale e nella lamina propria del testicolo***

	MAA	SNA
Gruppo 1 A	0	0 *
Gruppo 2 A	i + Lp +	i + Lp +

i: tessuto interstiziale; Lp: lamina propria dei tubuli seminiferi; 0: nessuna reattività; +: reattività; \*: in 4 casi di età compresa tra i 25 ed i 28 anni: i +; Lp +.

- ***Ovidotto***

### 3.1.3 Cellule epiteliali (Tabella 3)

In tutti gli ovidotti delle donne fertili esaminate, la MAA ha reagito con la membrana plasmatica luminale

delle cellule secernenti e con le ciglia e la membrana plasmatica luminale delle cellule ciliate (Fig. 3); anche nelle donne in postmenopausa è stata osservata la stessa reattività (Fig.4).

Nelle donne fertili è stata osservata reattività con l'SNA a livello delle ciglia e della membrana plasmatica luminale delle cellule ciliate (Fig. 5). Nelle cellule secernenti la reattività della membrana plasmatica luminale è stata osservata solo occasionalmente; lo stesso tipo di reattività è stato osservato anche nelle donne in postmenopausa (Fig. 6). Anche nelle donne più anziane tra quelle in postmenopausa, nonostante la mancanza di ciglia o la presenza solo di residui di esse, la membrana plasmatica luminale ha mostrato comunque reattività.

#### 3.1.4 Lamina propria (Tabella 3)

La reattività della MAA a livello della lamina propria è stata osservata solo in quattro soggetti tra le donne

fertili prese in esame (Fig. 3), mentre nella lamina propria di quasi tutte le donne in postmenopausa c'è stata reattività con questa lectina (Fig. 4).

La reattività della SNA con la lamina propria è stata osservata in cinque donne fertili e in sei donne in postmenopausa (Fig. 5 e 6).

#### 3.1.5 Endotelio (Tabella 3)

In tutti i campioni di tube di donne fertili, fatta eccezione per due casi, le cellule endoteliali dei vasi hanno reagito con la MAA (Fig. 3). Anche nelle donne in postmenopausa, tutti i casi presentavano reattività a livello dell'endotelio (Fig. 4) ad eccezione delle due donne più anziane. In tutte le donne fertili ed in postmenopausa, è stata osservata reattività con la SNA (Fig. 5 e 6), ed eccezione delle due donne più anziane.

**Tabella 3-Localizzazione della reattività delle lectine MAA ed SNA nell'ovidotto**

Biopsia n°	Cellule epiteliali				Lamina propria				Cellule endoteliali			
	MAA		SNA*		MAA		SNA		MAA		SNA	
	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I
<i>Donne fertili (gruppo 1B)</i>												
02/17335	+	-	+	-	0	-	+	-	+	-	+	-
03/17850	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
99/17822	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
03/21850	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
02/27822	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+
97/19913	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
03/24111	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+
02/27824	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+
97/21298	+	-	+	-	0	-	0	-	+	-	+	-
<i>Donne in postmenopausa (gruppo 2B)</i>												
97/16677	+	-	+	-	0	-	0	-	+	-	+	-
97/21945	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
97/21661	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+
97/19216	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97/16060	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
97/21299	-	+	-	+	-	+	-	0	-	+	-	+
97/16355	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97/16866	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+
97/17091	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
97/13074	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0

A: porzione ampollare; I: porzione istmica; 0: nessuna reattività; +: reattività; -: mancanza della porzione ampollare o istmica; \*: solo le cellule ciliate

### **3.2 Localizzazione della reattività con PNA con e senza trattamenti chimici ed enzimatici**

- ***Testicolo***

#### **3.2.1 Cellule dei tubuli seminiferi (Tabella 4)**

In entrambi i gruppi di studio, 1A e 2A, è stata osservata reattività con PNA a livello delle cellule dei tubuli seminiferi, con e senza trattamenti con neuraminidasi, deacetilazione-neuraminidasi, ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi e ossidazione differenziale moderata-deacetilazione-neuraminidasi (Fig. 7,8,9,10,11).

In seguito al trattamento con ossidazione differenziale forte-neuraminidasi e con ossidazione differenziale forte-deacetilazione-neuraminidasi, non è stata osservata nessuna reattività con PNA in nessuna componente testicolare, sia nel gruppo 1A che nel gruppo 2A. (Fig. 12,13).

**Tabella 4-Localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule dei tubuli seminiferi del testicolo**

	PNA	Neu PNA	KOH- Neu- PNA	1mMOD- Neu-PNA	44mMOD- Neu-PNA	1mMOD- KOH- Neu-PNA	44mMOD- KOH- Neu-PNA
Gruppo 1 A	Se + sg + sc + sp +	Se+ sg + sc + sp +	Se + sg + sc + sp +	Se + sg + sc + sp +	0	Se + sg + sc + sp +	0
Gruppo 2 A	Se + sg + sc+ sp +	Se + sg + sc + sp +	Se + sg + sc + sp +	Se + sg + sc + sp +	0	Se + sg + sc + sp +	0

Se: cellule del Sertoli; sg: spermatogoni; sc: spermatociti; sp: spermatidi; 0: nessuna reattività; +: reattività.

### 3.2.2 Tessuto interstiziale, lamina propria, cellule di Leydig e cellule endoteliali (Tabella 5)

La reattività con PNA nel gruppo 1A, con e senza trattamenti con neuraminidasi e deacetilazione-neuraminidasi, è stata osservata in tutte le componenti



testicolari (Fig. 7), mentre nel gruppo 2A è stata osservata reattività solo a livello del tessuto interstiziale e della lamina propria (Fig. 8,9,10,11).

In seguito a trattamenti di ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi e ossidazione differenziale moderata-deacetilazione-neuraminidasi, la localizzazione della reattività con PNA nelle varie componenti testicolari di entrambi i gruppi di studio, è stata la stessa rispetto a quanto osservato senza i trattamenti.

Dopo ossidazione differenziale forte-neuraminidasi e ossidazione differenziale forte-deacetilazione-neuraminidasi, la reattività della PNA era localizzata a livello della lamina propria nel gruppo 1A (Fig. 12) e nel tessuto interstiziale e nella lamina propria del gruppo 2A (Fig. 13).

**Tabella 5-Localizzazione della reattività della lectina PNA nella lamina propria, nelle cellule di Leydig e nell'endotelio dei vasi sanguigni**

	PNA	Neu PNA	KOH- Neu- PNA	1mMOD- Neu-PNA	44mMOD- Neu-PNA	1mMOD- KOH- Neu-PNA	44mMOD- KOH- Neu-PNA
Gruppo 1 A	i+ Lp+ L+ e+	i+ Lp+ L+ e+	i+ Lp+ L+ e +	i+ Lp+ L+ e+	Lp+	i+ Lp+ L+ e+	Lp+
Gruppo 2 A	i+ Lp+	i+ Lp+	i + Lp +	i+ Lp+	i+ Lp+	i+ Lp+	i+ Lp+

i: tessuto interstiziale; Lp: lamina propria dei tubuli seminiferi; L: cellule Leydig; e: endotelio; 0: nessuna reattività; +: reattività.

- **Ovidotto**

### 3.2.3 Cellule epiteliali (Tabelle 6 e 7)

Nelle donne fertili (Tabella 6), le cellule epiteliali secernenti non hanno reagito con la PNA, mentre è stata osservata reattività a livello della membrana

plasmatica luminale e delle ciglia delle cellule ciliate (Fig. 14).

Dopo trattamento con neuraminidasi e trattamento di deacetilazione-neuraminidasi, è stata osservata reattività a livello della membrana plasmatica luminale delle cellule secernenti e a livello delle cellule ciliate (Fig.14).

L'ossidazione differenziale moderata, seguita da trattamento con neuraminidasi con e senza deacetilazione ha mostrato la stessa localizzazione di reattività con PNA nei due tipi di cellule epiteliali, rispetto ai trattamenti precedentemente menzionati (Fig. 15).

**Tabella 6 –Donne fertili (gruppo 1B): localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule epiteliali oviduttali**

Biopsia n°	PNA		Neu-PNA		KOH-Neu-PNA		1mM OD-Neu-PNA		44m MOD-Neu-PNA		1mM OD-KOH-Neu-PNA		44m MOD-KOH-Neu-PNA	
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
02/17335														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
03/17850														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
99/17822														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
03/21850														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
02/27822														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/19913														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
03/24111														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
02/27824														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/21298														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0

A: porzione ampollare; I: porzione istmica; S: cellule secernenti; C: cellule ciliate; 0: nessuna reattività; +: reattività.

In tutte le pazienti in postmenopausa (Tabella 7),  
fatta eccezione per tre soggetti, è stata osservata

assenza di reattività a livello delle cellule secernenti, mentre è stata osservata reattività a livello delle ciglia e della membrana plasmatica luminale delle cellule ciliate (Fig. 16).

Dopo la digestione con neuraminidasi è stata osservata la presenza di reattività a livello della membrana plasmatica luminale delle cellule secernenti.

Dopo il trattamento di deacetilazione-neuraminidasi, la reattività della PNA è rimasta generalmente uguale a quella osservata dopo il solo trattamento enzimatico (inserto Fig. 16).

Dopo il trattamento di ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi, con o senza deacetilazione, è stata osservata la stessa localizzazione di reattività rispetto a quella osservata dopo i trattamenti neuraminidasi o deacetilazione-neuraminidasi (Fig. 17).

Dopo ossidazione differenziale forte, sia nelle donne fertili che in quelle in postmenopausa, la

reattività con la PNA è stata completamente abolita (Fig. 15 e 17).

**Tabella 7–Donne in postmenopausa (gruppo 2B): localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule epiteliali oviduttali**

Biopsia n°	PNA		Neu-PNA		KOH-Neu-PNA		1mM OD-Neu-PNA		44m MOD-Neu-PNA		1mM OD-KOH-Neu-PNA		44m MOD-KOH-Neu-PNA	
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
97/16677														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/21945														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/21661														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/19216														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/16060														
I	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/21299														
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/16355														
A	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/16866														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/17091														
A	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
97/13074														
A	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0
I	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0

A: porzione ampollare; I: porzione istmica; S: cellule secernenti; C: cellule ciliate; 0: nessuna reattività; +: reattività.

#### 3.2.4 Lamina propria (Tabelle 8 e 9)

Nelle donne fertili (Tabella 8) è stata costantemente osservata l'assenza di reattività con PNA (Fig. 14), così come nelle donne in postmenopausa (Tabella 9), ad eccezione di due casi (Fig. 16).

Dopo trattamento con neuraminidasi, è stata rilevata reattività a livello della lamina propria di tutte le donne fertili (inserto Fig. 14), mentre nelle donne in postmenopausa, è stata osservata in cinque casi a livello della porzione ampollare e in quattro casi a livello della porzione istmica.

Dopo trattamento con deacetilazione-neuraminidasi, la localizzazione di reattività è risultata la stessa rispetto a quella senza trattamento in tutte le donne fertili e in alcune in postmenopausa, mentre in altri casi di donne in postmenopausa, si è avuta comparsa di reattività (Fig. 16).



I trattamenti di ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi e ossidazione differenziale moderata-deacetilazione-neuraminidasi, hanno mostrato una perdita di reattività in tutti i casi di donne fertili presi in esame (Fig. 15), mentre in alcuni casi di donne in postmenopausa, la reattività è scomparsa (Fig. 17).

Dopo il trattamento ossidazione differenziale forte-neuraminidasi o ossidazione differenziale forte-deacetilazione-neuraminidasi, la reattività con PNA è scomparsa a livello della porzione ampollare ed istmica di tutte le donne fertili (inserto Fig. 15) e di quattro donne in postmenopausa, mentre negli altri casi la reattività è stata mantenuta (inserto Fig. 17).

**Tabella 8 –Donne fertili (gruppo 1B): localizzazione della reattività della lectina PNA nella lamina propria oviduttale**

Biopsia n°	PNA	Neu-PNA	KOH-Neu-PNA	1mM OD-Neu-PNA	44m MOD-Neu-PNA	1mM OD-KOH-Neu-PNA	44m MOD-KOH-Neu-PNA
02/17335							
A	0	+	+	0	0	0	0
03/17850							
A	0	+	+	+	0	+	0
I	0	+	+	+	0	+	0
99/17822							
A	0	+	+	+	0	+	0
I	0	+	+	+	0	+	0
03/21850							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
02/27822							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/19913							
A	0	+	+	0	0	0	0
03/24111							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
02/27824							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/21298							
A	0	+	+	0	0	0	0

A: porzione ampollare; I: porzione istmica; 0: nessuna reattività; +: reattività.

**Tabella 9 –Donne in postmenopausa (gruppo 2B): localizzazione della reattività della lectina PNA nella lamina propria oviduttale**

Biopsia n°	PNA	Neu-PNA	KOH-Neu-PNA	1mM OD-Neu-PNA	44m MOD-Neu-PNA	1mM OD-KOH-Neu-PNA	44m MOD-KOH-Neu-PNA
97/16677							
A	0	0	+	0	0	0	0
97/21945							
A	0	+	+	+	+	+	+
97/21661							
A	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	+	0	0	0	0
97/19216							
A	0	+	+	+	+	+	+
I	0	0	+	0	0	0	+
97/16060							
I	+	+	+	+	0	+	0
97/21299							
I	0	0	+	0	0	0	0
97/16335							
A	0	+	+	+	+	+	+
I	0	+	+	+	+	+	+
97/16866							
A	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	+	0	0	0	0
97/17091							
A	0	+	+	+	+	+	+
I	0	+	+	+	+	+	+
97/13074							
A	+	+	+	+	+	+	+
I	+	+	+	+	+	+	+

A: porzione ampollare; I: porzione istmica; 0: nessuna reattività; +: reattività.

### 3.2.5 Cellule endoteliali (Tabelle 10 e 11)

Nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni delle donne fertili (Tabella 10), la reattività con la PNA è stata osservata in un unico caso a livello della porzione istmica ed in quattro casi a livello della porzione ampollare, mentre nelle donne in postmenopausa (Tabella 11) è stata rilevata reattività soltanto a livello della porzione istmica in tre pazienti. In tutti gli altri casi non è stata rilevata alcuna reattività (Fig. 14 e 16).

Dopo digestione con neuraminidasi, la reattività con PNA in alcuni casi è comparsa sia nella porzione ampollare che istmica (Fig. 14), ad eccezione della porzione ampollare di due casi di donne in postmenopausa.

In seguito al trattamento di deacetilazione-neuraminidasi, la reattività con PNA non ha mostrato variazioni di localizzazione nelle donne fertili e in quelle in postmenopausa (inserto Fig. 16).

Dopo ossidazione differenziale moderata e forte, seguite da digestione con neuraminidasi con o senza deacetilazione, la reattività con PNA è scomparsa in tutti i casi sia di donne fertili, che in postmenopausa (Fig. 15 e inserto, 17 e inserto).

**Tabella 10 –Donne fertili (gruppo 1B): localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni oviduttali**

Biopsia n°	PNA	Neu-PNA	KOH-Neu-PNA	1mM OD-Neu-PNA	44m MOD-Neu-PNA	1mM OD-KOH-Neu-PNA	44m MOD-KOH-Neu-PNA
02/17335							
A	0	+	+	0	0	0	0
03/17850							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
99/17822							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
03/21850							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
02/27822							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/19913							
A	0	+	+	0	0	0	0
03/24111							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
02/27824							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/21298							
A	0	+	+	0	0	0	0

A: porzione ampollare; I: porzione istmica; 0: nessuna reattività; +: reattività.

**Tabella 11 –Donne in postmenopausa (gruppo 2B): localizzazione della reattività della lectina PNA nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni oviduttali**

Biopsia n°	PNA	Neu-PNA	KOH-Neu-PNA	1mM OD-Neu-PNA	44m MOD-Neu-PNA	1mM OD-KOH-Neu-PNA	44m MOD-KOH-Neu-PNA
97/16677							
A	0	+	+	0	0	0	0
97/21945							
A	0	+	+	0	0	0	0
97/21661							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/19216							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/16060							
I	0	+	+	0	0	0	0
97/21299							
I	0	+	+	0	0	0	0
97/16335							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/16866							
A	0	+	+	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/17091							
A	0	0	0	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0
97/13074							
A	0	0	0	0	0	0	0
I	0	+	+	0	0	0	0

A: porzione ampollare; I: porzione istmica; 0: nessuna reattività; +: reattività.

### **3.3 Analisi statistica dell'intensità di reattività delle lectine**

- ***Testicolo***

#### **3.3.1 Differenze dell'intensità di reattività della PNA, con o senza trattamenti, in ogni gruppo**

*Cellule dei tubuli seminiferi* – In tutte le cellule dei tubuli seminiferi di tutti i casi sia del gruppo 1A che del gruppo 2A, l'intensità di reattività osservata con PNA dopo trattamento con neuraminidasi, era maggiore rispetto a quanto osservato senza il trattamento ( $P < 0.01$ ). L'intensità di reattività osservata a livello delle cellule di Sertoli, degli spermatogoni e degli spermatociti nel gruppo 1A con PNA dopo trattamento con deacetilazione-neuraminidasi, era maggiore se confrontata con quella osservata dopo trattamento con la sola neuraminidasi ( $P < 0.01$ ). Nelle cellule dei tubuli seminiferi di entrambi i gruppi di studio, l'intensità di



reattività della PNA in seguito a trattamento con ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi e ossidazione differenziale moderata-deacetilazione-neuraminidasi era minore rispetto a quanto osservato senza ossidazione differenziale moderata ( $P<0.01$ ).

*Tessuto interstiziale, lamina propria, cellule di Leydig e cellule endoteliali dei vasi* – L'intensità di reattività osservata con PNA dopo trattamento con neuraminidasi, era maggiore rispetto a quanto osservato senza trattamento nel tessuto interstiziale, nella lamina propria e nelle cellule endoteliali del gruppo 1A e nella lamina propria del gruppo 2A ( $P<0.01$ ). In seguito a trattamento con deacetilazione-neuraminidasi, l'intensità di reattività osservata con PNA era maggiore a livello delle cellule di Leydig del gruppo 1A ( $P<0.01$ ). Nel gruppo 1A, a livello del tessuto interstiziale, della lamina propria e delle cellule endoteliali dopo ossidazione differenziale moderata-

neuraminidasi e di tutte le componenti stromali dopo ossidazione differenziale moderata-deacetilazione-neuraminidasi, è stata evidenziata un'intensità di reattività con PNA inferiore a quanto osservato in seguito a trattamento senza ossidazione differenziale moderata ( $P<0.01$ ). Nel gruppo 2A, dopo trattamento con ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi e/o ossidazione differenziale moderata-deacetilazione-neuraminidasi e ossidazione differenziale forte-neuraminidasi e/o ossidazione differenziale forte-deacetilazione-neuraminidasi, le cellule interstiziali e la lamina propria, hanno mostrato un'intensità di reattività inferiore rispetto a quanto osservato senza i trattamenti con ossidazione differenziale moderata e forte ( $P<0.01$ ).

### 3.3.2 Differenze di intensità di reattività delle lectine tra i due gruppi di studio

*Cellule dei tubuli seminiferi* – L'intensità di reattività osservata con PNA con e senza il trattamento con neuraminidasi, era maggiore nelle cellule di Sertoli, negli spermatogoni e negli spermatociti del gruppo 2A rispetto al gruppo 1A ( $P < 0.01$ ). L'intensità di reattività con PNA dopo il trattamento con deacetilazione-neuraminidasi era minore nelle cellule di Sertoli, negli spermatogoni e negli spermatociti del gruppo 2A rispetto al gruppo 1A ( $P < 0.01$ ). In seguito a trattamento con ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi con e senza deacetilazione, l'intensità di reattività osservata con PNA, era minore negli spermatociti del gruppo 1A rispetto al gruppo 2A ( $P < 0.01$ ).

*Tessuto interstiziale, lamina propria, cellule di Leydig e cellule endoteliali dei vasi* – E' stata osservata un'intensità di reattività con SNA maggiore nel tessuto

interstiziale e nella lamina propria dei casi del gruppo 2A rispetto a quanto osservato in 4 casi di età compresa tra i 25 ed i 28 anni del gruppo 1A ( $P<0.01$ ). L'intensità di reattività osservata con PNA, era inferiore nel tessuto interstiziale e nella lamina propria del gruppo 1A rispetto al gruppo 2A ( $P<0.01$ ); dopo il trattamento con neuraminidasi e con deacetilazione-neuraminidasi, l'intensità di reattività era inferiore solo nella lamina propria del gruppo 1A rispetto al gruppo 2A ( $P<0.01$ ). Il tessuto interstiziale dei pazienti del gruppo 1A dopo trattamento con ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi, con e senza deacetilazione, e la lamina propria dopo ossidazione differenziale forte, con e senza deacetilazione, hanno mostrato un'intensità di reattività maggiore rispetto al gruppo 2A ( $P<0.01$ ).

- **Ovidotto**

3.3.3 Differenze dell'intensità di reattività della PNA, con o senza trattamenti, in ogni gruppo

*Cellule epiteliali* - In tutti i casi del gruppo 1B, l'intensità di reattività della PNA dopo digestione con neuraminidasi era significativamente più alta rispetto a quella delle cellule ciliate ( $P < 0.01$ ) e, nel gruppo 2B, rispetto a quella delle cellule secernenti dei casi 97/16060, 97/16355, 97/17091 ( $P < 0.01$ ) e delle cellule ciliate dei casi 97/21661, 97/19216, 97/16060, 97/17091, 97/13074 ( $P < 0.05$ ). Dopo trattamento di deacetilazione-neuraminidasi, nel gruppo 1B l'intensità di reattività della PNA era significativamente più alta se confrontata con l'intensità di reattività della PNA dopo digestione con neuraminidasi nelle cellule secernenti e nelle cellule ciliate di tutti i casi, e nel gruppo 2B nelle cellule secernenti dei casi 97/16677, 97/21945,

97/21661, 97/19216, 97/21299 e nelle cellule ciliate dei casi 97/16677, 97/21299 ( $P < 0.05$ ).

*Lamina propria* - Nel gruppo 2B l'intensità di reattività alla PNA dopo digestione con neuraminidasi era più alta rispetto a quella della lamina propria del caso 97/13074 ( $P < 0.05$ ). Nel gruppo 1B, l'intensità di reattività dopo deacetilazione-neuraminidasi era più alta rispetto a quella riscontrata dopo trattamento con neuraminidasi nei casi 02/17335, 03/17850, 99/17822, 02/27824, 97/21298 ( $P < 0.01$ ), e nel gruppo 2B, nei casi 97/16355, 97/17091, 97/13074 ( $P < 0.05$ ).

*Cellule endoteliali* - Nel gruppo 2B, l'intensità di reattività alla PNA dopo deacetilazione-neuraminidasi era più alta rispetto a quella osservata dopo neuraminidasi nei casi 97/16060, 97/21299, 97/16355, 97/16866, 97/13074 ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.4 Differenze tra reattività della PNA dopo trattamento di deacetilazione-neuraminidasi e reattività di MAA ed SNA

*Cellule epiteliali* - Nelle cellule epiteliali del gruppo 1B, l'intensità di reattività dopo deacetilazione-neuraminidasi era più alta rispetto all'intensità di reattività della MAA, nei casi 99/17822, 03/24111, 02/27824 e rispetto all'intensità di reattività della SNA nei casi 99/17822, 03/24111, ( $P < 0.05$ ).

*Lamina propria* - L'intensità di reattività alla PNA nel gruppo 1B dopo trattamento di deacetilazione-neuraminidasi era più alta rispetto a quella della MAA e della SNA nei casi 03/17850, 99/17822 ( $P < 0.05$ ). Nel gruppo 2B era più alta rispetto all'intensità di reattività della MAA e della SNA nei casi 97/16355, 97/17091, 97/13074 e più bassa rispetto all'intensità di reattività della MAA nel caso 97/21299 ( $P < 0.05$ ).

*Cellule endoteliali* - L'intensità di reattività della PNA nel gruppo 1B dopo deacetilazione-neuraminidasi

era più alta rispetto a quella della MAA nei casi 02/17335, 03/17850, 03/17822, 97/19913, 03/24111, 97/21298 ( $P < 0.05$ ); se confrontata con quella della SNA, era più alta nei casi 03/17850, 03/17822, 97/19913, 03/24111, 97/21298 e più bassa nel caso 02/17335 ( $P < 0.05$ ).

#### 3.3.5 Differenze di reattività delle lectine tra le donne fertili (gruppo 1B)

L'intensità di reattività della MAA era più alta nei casi 03/21850 e 03/24111 rispetto a tutti gli altri. L'intensità di reattività della SNA era più alta nei casi 02/17335, 03/17850, 99/17822, 03/21850, 02/27822, 03/24111 ( $P < 0.01$ ).

#### 3.3.6 Differenze di reattività delle lectine tra le donne in postmenopausa (gruppo 2B)

*Cellule epiteliali-* L'intensità di reattività alla PNA era più alta nelle cellule ciliate dei casi 97/21945,



97/16355, 97/16866, rispetto agli altri ( $P<0.05$ ). L'intensità di reattività con la PNA dopo digestione con neuraminidasi e ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi era più alta nelle cellule secernenti dei casi 97/16060, 97/16866, 97/17091, 97/13074 e nelle cellule ciliate dei casi 97/21945, 97/21661, 97/19216, 97/16060, 97/16355, 97/16866, 97/17091, 97/13074 ( $P<0.05$ ). L'intensità di reattività alla PNA dopo trattamento di deacetilazione-neuraminidasi e ossidazione differenziale moderata-deacetilazione-neuraminidasi era più bassa nelle cellule secernenti del caso 97/16335 rispetto agli altri ( $P<0.05$ ).

*Lamina propria*- L'intensità di reattività alla MAA era più bassa nei casi 97/16866, 97/17091, mentre quella della SNA era più bassa nel caso 97/17091 ( $P<0.05$ ). L'intensità di reattività della PNA era più bassa nel caso 97/13074 e dopo trattamento di deacetilazione-neuraminidasi era più bassa nei casi 97/16677, 97/21661, 97/21299, 97/16866 ( $P<0.01$ ).

*Cellule endoteliali* - L'intensità di reattività della PNA dopo neuraminidasi era più bassa nei casi 97/16060, 97/21299, 97/16355, 97/16866, 97/13074 ( $P<0.05$ ).

3.3.7 Differenze di reattività delle lectine tra i due gruppi di studio (donne fertili ed in postmenopausa)

*Cellule epiteliali*- L'intensità di reattività della PNA nelle cellule ciliate di tutti i casi del gruppo 2B era più alta rispetto al gruppo 1B ( $P<0.05$ ). L'intensità di reattività della PNA dopo neuraminidasi e ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi era più alta nelle cellule secernenti dei casi 97/16060, 97/16866, 97/17091, 97/13074 del gruppo 2B e nelle cellule ciliate dei casi 97/21945, 97/21661, 97/19216, 97/16060, 97/16355, 97/16866, 97/17091, 97/13074 del gruppo 2B, se confrontate con il gruppo 1B ( $P<0.05$ ).

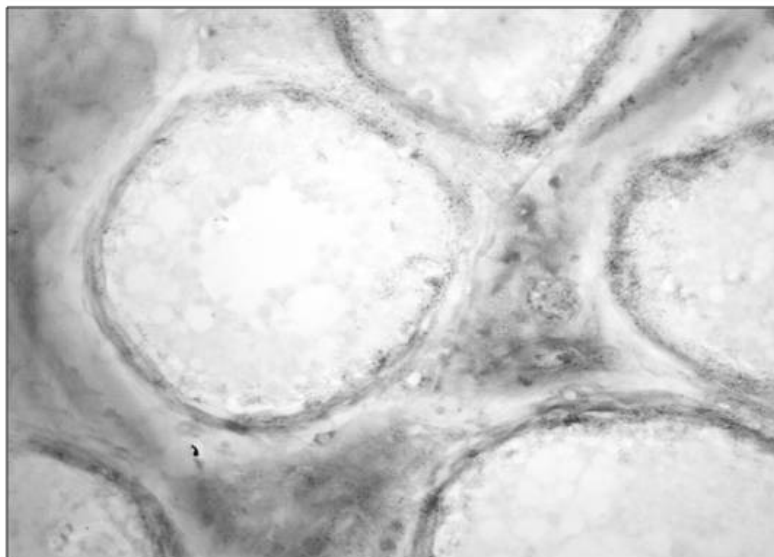
*Lamina propria*- L'intensità di reattività della MAA in tutti i casi del gruppo 1B era più alta rispetto ai casi 97/16866, 97/17091 del gruppo 2B ( $P<0.05$ ). L'intensità di reattività della SNA era più alta solo rispetto al caso 97/17091 ( $P<0.05$ ). L'intensità di reattività della PNA dopo digestione con neuraminidasi era più bassa nei casi 02/17335, 03/17850, 99/17822, 02/27824, 97/21298 del gruppo 1B, rispetto ai casi che mostrano reattività del gruppo 2B ( $P<0.05$ ). Dopo ossidazione differenziale moderata-neuraminidasi, l'intensità di reattività della PNA era più bassa nei casi del gruppo 2B che mostravano reattività, rispetto al gruppo 1B ( $P<0.05$ ). L'intensità di reattività della PNA dopo deacetilazione-neuraminidasi era più alta nel gruppo 1B rispetto ai casi 97/16677, 97/21661, 97/21299, 97/16866 del gruppo 1B ( $P<0.01$ ).

*Cellule endoteliali*- L'intensità di reattività della MAA dei casi 02/17335, 03/17850, 99/17822, 97/19913, 97/21298, e quella della SNA dei casi

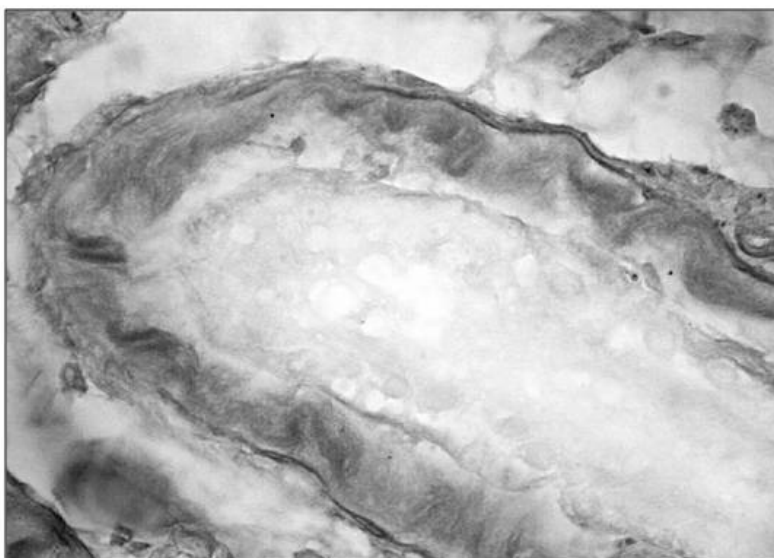
97/19913, 02/27824, 97/21298 del gruppo 1B, era più bassa rispetto al gruppo 2B ( $P < 0.01$ ). L'intensità di reattività della PNA dopo neuraminidasi era più alta nel gruppo 1B rispetto ai casi 97/16060, 97/21299, 97/16355, 97/16866, 97/13074 del gruppo 2B ( $P < 0.05$ ).

### **3.4 Controlli**

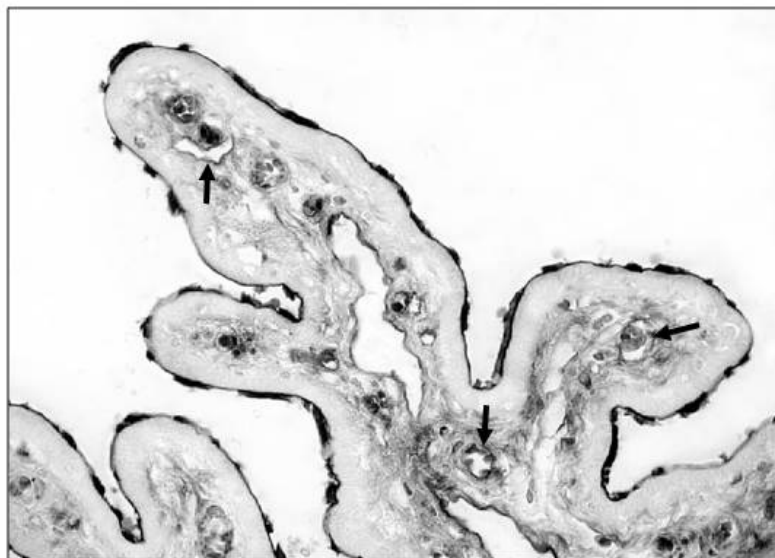
Le sezioni incubate con lectine legate ai loro specifici zuccheri e le sezioni incubate con lectine non coniugate, sono risultate non colorate; le sezioni incubate con il tampone senza l'enzima non hanno mostrato cambiamenti nel legame con le lectine. Le prove dell'efficacia della digestione enzimatica hanno dato i risultati aspettati, mentre la procedura di desolfatazione non ha dato prova di modificare il legame delle lectine.



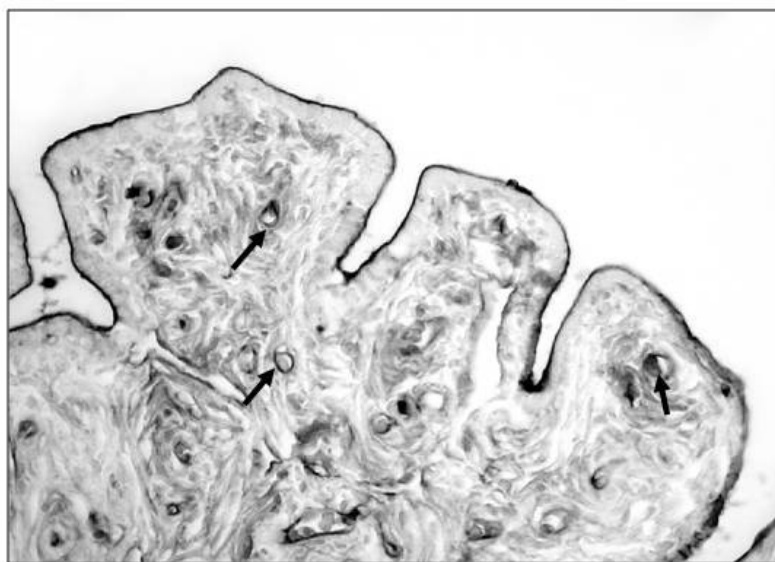
**Fig.1 –MAA (testicolo) – 75 anni.** E' osservabile una moderata reattività a livello del tessuto interstiziale e una debole e/o moderata reattività a livello della lamina propria. X200.



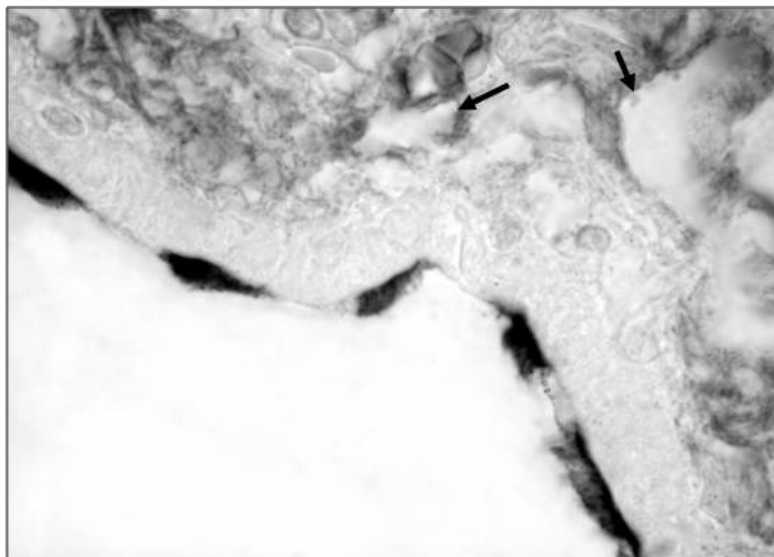
**Fig.2 – SNA (testicolo) – 90 anni.** E' visibile una moderata reattività nel tessuto interstiziale e a livello della lamina propria, che risulta essere assottigliata. X400.



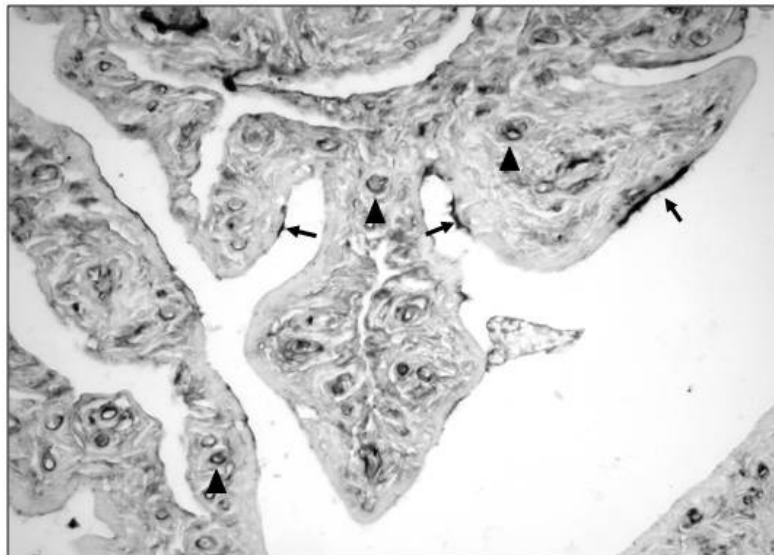
**Fig. 3 – MAA - Biopsia n° 03/17850 – (Donna fertile in fase proliferativa precoce) – porzione ampollare.** E' osservabile una forte reattività sulla superficie luminale di tutte le cellule epiteliali, mentre una minor reattività è osservabile nella lamina propria e nelle cellule endoteliali (freccette). X400.



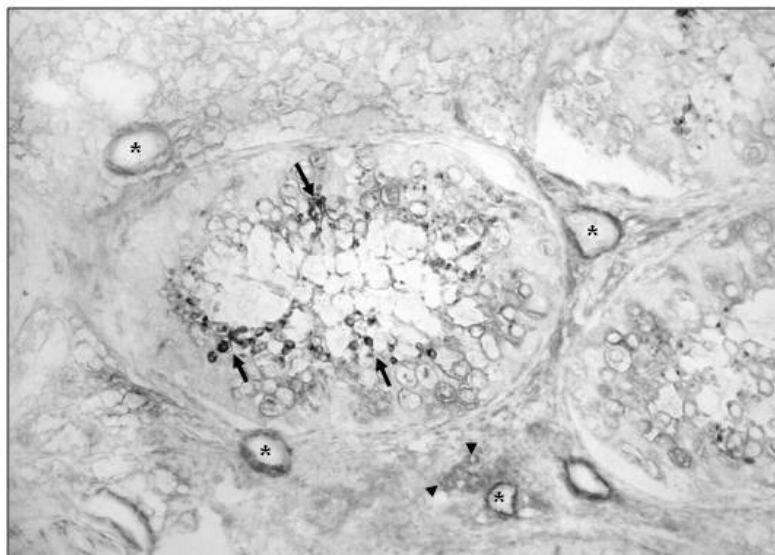
**Fig. 4 – MAA - Biopsia n° 97/16060 – (Donna in postmenopausa) – parte distale dell'istmo.** Sulla superficie luminale delle cellule epiteliali e delle cellule endoteliali (freccette) è visibile una forte reattività, mentre la lamina propria reagisce moderatamente. X400.



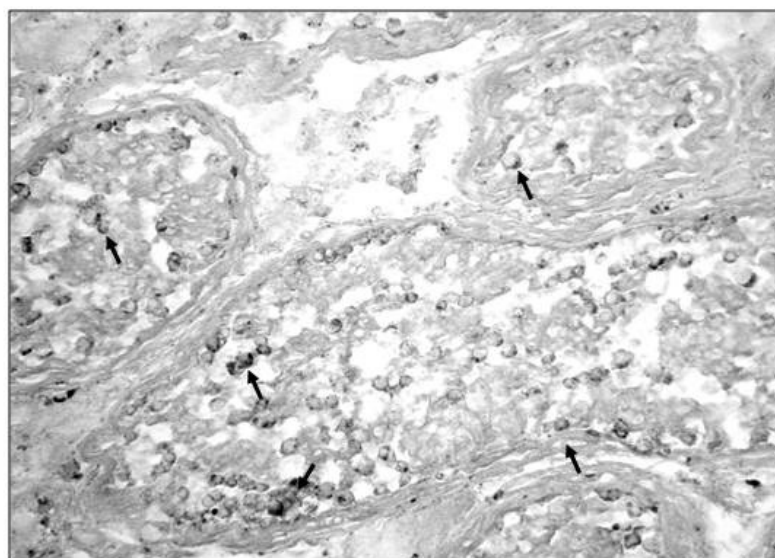
**Fig. 5 – SNA - Biopsia n° 03/17850 – (Donna fertile in fase proliferativa precoce) – porzione istmica.** E' presente reattività sulle ciglia e sulla superficie luminale delle cellule ciliate, nella lamina propria e nelle cellule endoteliali (freccie). X1000.



**Fig. 6 – SNA - Biopsia n° 97/16060 – (Donna in postmenopausa) – porzione istmica.** Le ciglia e la superficie luminale di poche cellule ciliate (freccie) e le cellule endoteliali (punte di freccia) reagiscono fortemente. La lamina propria mostra moderata reattività. X400.

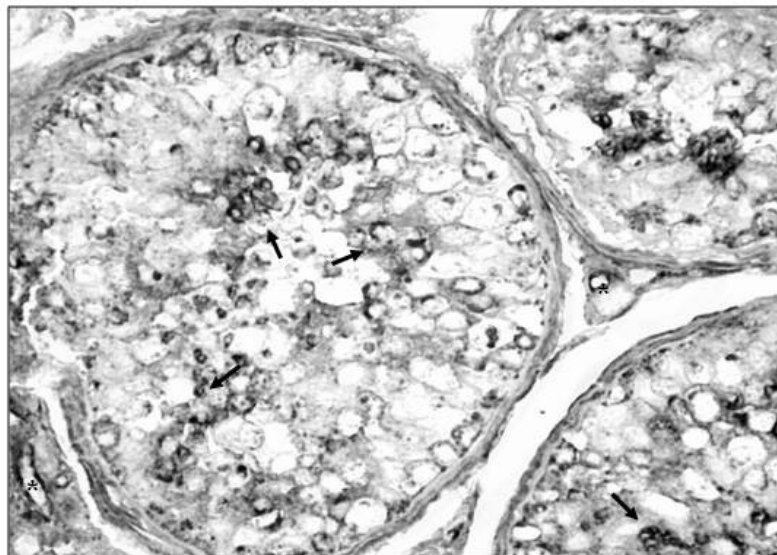


**Fig. 7 – PNA (testicolo) – 27 anni.** Le cellule del Sertoli, gli spermatogoni, gli spermatociti, il tessuto interstiziale, la lamina propria e le cellule di Leydig (punte di freccia) mostrano una debole reattività. Gli spermatidi presentano moderata e/o forte reattività (freccie); le cellule endoteliali (asterischi) presentano reattività moderatamente. X200.

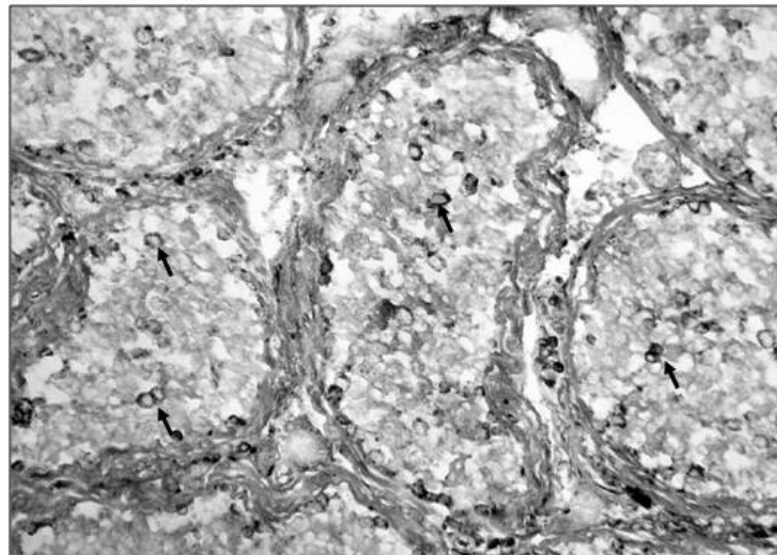


**Fig. 8 – PNA (testicolo) – 93 anni.** Le cellule del Sertoli, gli spermatogoni e gli spermatociti mostrano moderata reattività. Negli spermatidi, la reattività va da moderata a forte (freccie). Il tessuto interstiziale e la lamina propria reagiscono moderatamente. X200.

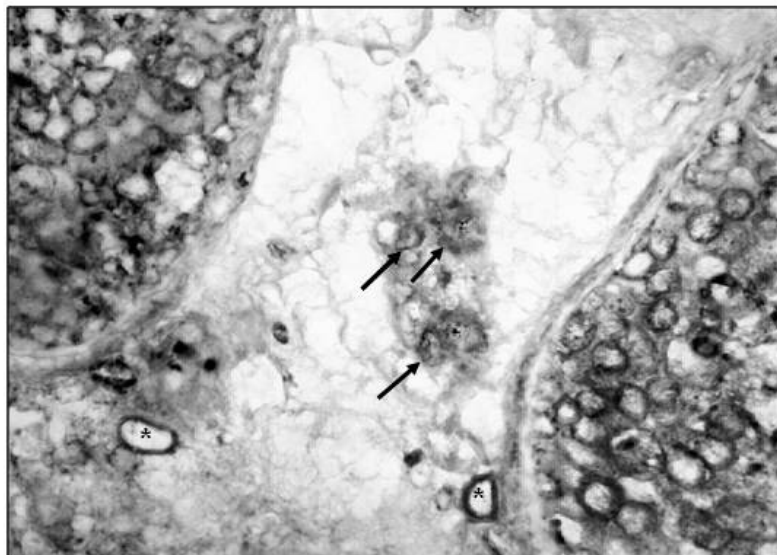




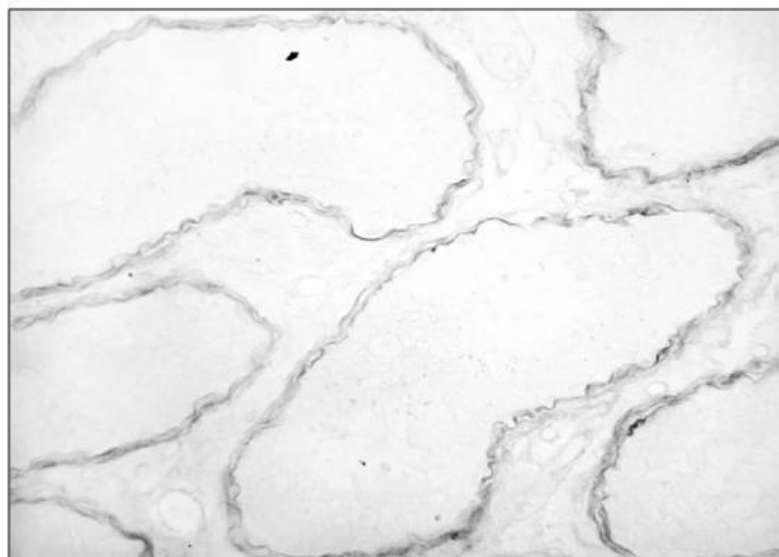
**Fig. 9 – Neuraminidasi-PNA (testicolo) – 27 anni.** Le cellule del Sertoli, gli spermatogoni e gli spermatociti presentano moderata reattività, mentre negli spermatidi si osserva forte reattività (freccie). Nel tessuto interstiziale e nella lamina propria la reattività è moderata. Le cellule endoteliali (asterischi) presentano forte reattività. X400.



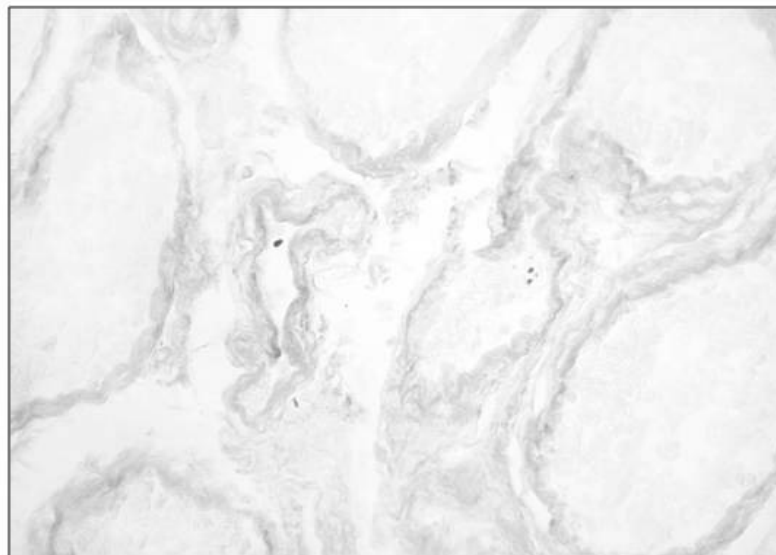
**Fig. 10 - Neuraminidasi-PNA (testicolo) – 93 anni.** Nelle cellule del Sertoli, negli spermatogoni e negli spermatociti è osservabile reattività moderata e/o forte. Gli spermatidi (freccie) presentano reattività forte. Il tessuto interstiziale reagisce moderatamente, mentre la lamina propria mostra reattività moderata e/o forte. X200.



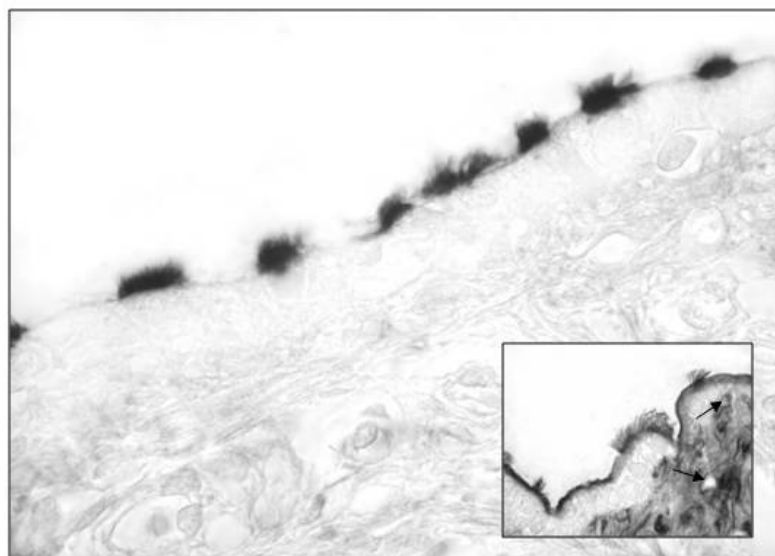
**Fig. 11 – KOH-neuraminidasi-PNA (testicolo) – 27 anni.** Le cellule del Sertoli e le cellule germinali mostrano forte reattività. Al livello del tessuto interstiziale, della lamina propria e delle cellule di Leydig (punte di freccia) è visibile reattività moderata. Le cellule endoteliali dei vasi (asterischi) presentano reattività forte. X400.



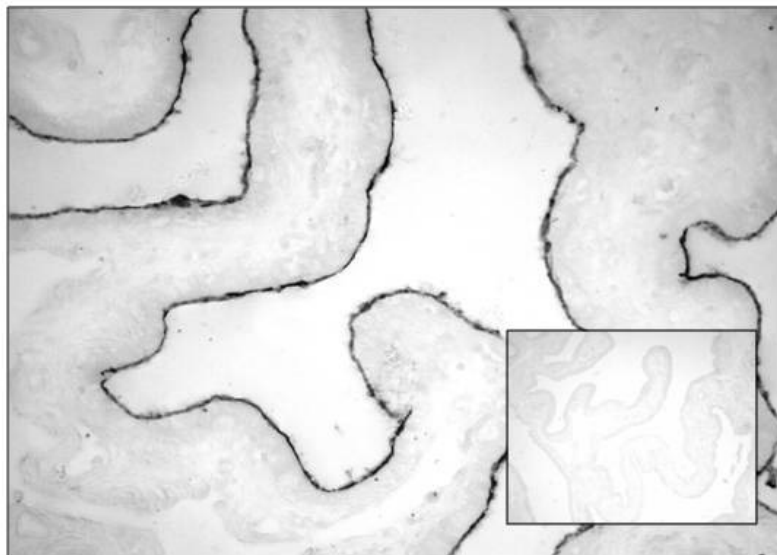
**Fig. 12 – Ossidazione differenziale forte-KOH-neuraminidasi-PNA (testicolo) – 27 anni.** E' osservabile soltanto una moderata reattività a livello della lamina propria. X200.



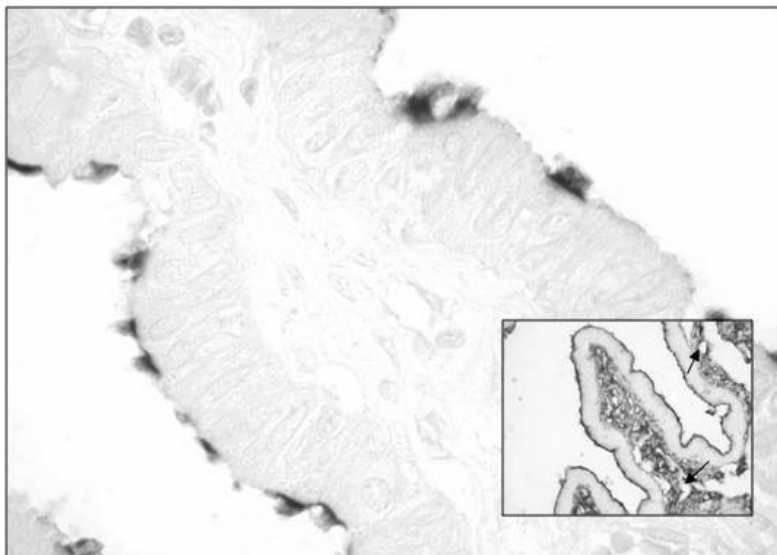
**Fig. 13 – Ossidazione differenziale forte-KOH-neuraminidasi-PNA (testicolo) – 93 anni.** E' osservabile una reattività molto debole nel tessuto interstiziale e debole nella lamina propria. X200.



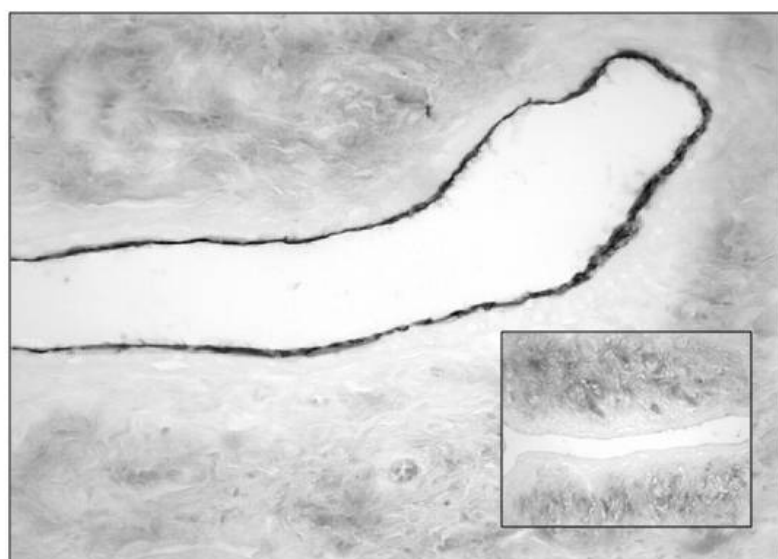
**Fig. 14– PNA - Biopsia n° 03/21850 – (Donna fertile in fase proliferativi tardiva) – porzione istmica.** Le ciglia e la superficie luminale delle cellule ciliate mostrano reattività. X1000. **Inserto- Neuraminidasi-PNA.** La reattività è osservabile a livello delle ciglia e della superficie luminale delle cellule ciliate, della superficie luminale delle cellule secernenti, della lamina propria e delle cellule endoteliali (freccie). X170.



**Fig. 15 – Ossidazione differenziale moderata-KOH-neuraminidasi-PNA - Biopsia n° 03/21850 – (Donna fertile in fase proliferativi tardiva) – porzione ampollare.** La reattività è localizzata a livello della superficie luminale delle cellule epiteliali. X200. **Inserto – Ossidazione differenziale forte-KOH-neuraminidasi-PNA.** La reattività è completamente scomparsa. X20.



**Fig. 16 – PNA - Biopsia n° 97/21945 – (Donna in postmenopausa) – porzione ampollare.** E' osservabile una forte reattività a livello delle ciglia e della superficie luminale delle cellule ciliate. X400. **Inserto - KOH-neuraminidasi-PNA.** La reattività è localizzata a livello della superficie luminale di tutte le cellule epiteliali, della lamina propria e delle cellule endoteliali (freccce). X70.



**Fig. 17– Ossidazione differenziale moderata-KOH-neuraminidasi-PNA - Biopsia n° 97/13074 – (Donna in postmenopausa) – porzione istmica.** La reattività è localizzata a livello della superficie luminale delle cellule epiteliali e della lamina propria. X400. **Inserto – Ossidazione differenziale forte-KOH-neuraminidasi-PNA.** La reattività è visibile solo a livello della lamina propria. X40.

## 4 DISCUSSIONE

I risultati ottenuti mediante l'istochimica delle lectine, per quanto concerne il testicolo, hanno dimostrato la presenza di una grande quantità di acido sialico nelle cellule dei tubuli seminiferi e in tutte le componenti stromali in entrambi i gruppi di studio (gruppo 1A: uomini di età compresa tra i 18 ed i 30 anni; gruppo 2A: uomini di età compresa tra i 70 ed i 93 anni). Peraltro, sono state rilevate alcune differenze intra- e intergruppo nella distribuzione e nei tipi di acido sialico.

In particolare, diversamente da quanto affermato da Arenas et al.<sup>8</sup>, la lectina SNA ha messo in evidenza acido sialico legato con legame  $\alpha$  2-6 a galattosio o N-acetil-D-galattosamina nel tessuto interstiziale e nella lamina propria in alcuni soggetti del gruppo 1A e nella totalità del gruppo 2A. Inoltre esistono discordanze anche riguardo alla presenza di acido sialico legato con

legame  $\alpha$  2-3 al galattosio, messo in evidenza dalla lectina MAA. Infatti, secondo Arenas et al.<sup>8</sup> questo tipo di acido sialico era presente in tutte le componenti dei tubuli seminiferi, nella lamina propria e nelle cellule di Leydig indipendentemente dall'età, mentre nella presente tesi è stato evidenziato solo nelle cellule interstiziali e nella lamina propria dei soggetti del gruppo 2A. Le discrepanze tra i dati che emergono da questa tesi e quelli di Arenas et al.<sup>8</sup>, potrebbero essere correlate all'impiego di un diverso fissativo. Infatti, mentre tali autori usarono formaldeide in PBS, nella presente tesi è stato usato il liquido di Carnoy. Confrontando vari fissativi in lavori precedenti condotti dal gruppo di ricerca di cui faccio parte, è stato sperimentato che il liquido di Carnoy è il fissativo più adatto nel mantenimento del contenuto carboidratico nei tessuti dei vari organi, compresi tessuti particolarmente delicati, come quelli embrionali<sup>28-31</sup>.

L'utilizzo della lectina PNA, in associazione con trattamenti chimici ed enzimatici, ha evidenziato la presenza di acido sialico legato al D-galattosio- $\beta$ (1-3)-N-acetil-D-galattosamina nelle cellule dei tubuli seminiferi in entrambi i gruppi di studio. Questo tipo di acido sialico è stato osservato anche nel tessuto interstiziale, nella lamina propria e nell'endotelio degli uomini del gruppo 1A, mentre nel gruppo 2A è stato osservato solo nella lamina propria. In tutti i casi del gruppo 1A, è stato trovato acido sialico contenente gruppi acetilici su C<sub>4</sub> dell'anello piranosidico nelle cellule di Sertoli, negli spermatogoni e negli spermatociti. Nei casi del gruppo 2A, è stato osservato soltanto acido sialico non acetilato in tutte le componenti testicolari. E' da notare che nelle cellule di Leydig dei soggetti del gruppo 1A, era presente acido sialico acetilato in C<sub>4</sub> legato al D-galattosio- $\beta$ (1-3)-N-acetil-D-galattosamina, mentre non è stato trovato acido sialico nelle stesse cellule dei pazienti del gruppo 2A. E' stato osservato



acido sialico acetilato in C<sub>9</sub> legato con legame  $\alpha$  2-3 al galattosio nella lamina propria dei soggetti del gruppo 1A.

In base a tutte queste osservazioni, risulta evidente che nell'uomo, con l'avanzare dell'età, avvengono cambiamenti del metabolismo dei sialoderivati nelle varie componenti testicolari. Considerando l'importanza degli acidi sialici nei fenomeni di riconoscimento intercellulare e/o intramolecolare e nel rafforzamento della stabilità di membrana<sup>1,4,32,33</sup>, questa alterazione potrebbe essere correlata ad alcuni dei diversi cambiamenti morfofunzionali osservabili nelle varie componenti testicolari durante l'invecchiamento<sup>20-22,34-40</sup>. In particolare, la modificazione dell'acetilazione dell'acido sialico nelle cellule di Sertoli e durante lo sviluppo delle cellule germinali negli uomini più anziani, potrebbe svolgere un ruolo importante nell'alterazione delle strutture di queste cellule e delle interazioni

intercellulari delle cellule di Sertoli con le cellule germinali durante la loro maturazione. D'altra parte, durante l'invecchiamento è stata osservata un'alterazione dell'ultrastruttura delle cellule di Sertoli, l'arresto della divisione cellulare delle cellule germinali ed una diminuzione del numero di entrambi i tipi di cellule<sup>20-22,34-36,38,40</sup>. La mancanza di acido sialico nelle cellule di Leydig potrebbe essere correlata all'alterazione della struttura di queste cellule, osservata in altri studi<sup>36,39,40</sup>. Questo, insieme ad una diminuzione di numero di tali cellule potrebbe contribuire a determinare una riduzione della produzione di androgeni. Tutti questi cambiamenti potrebbero svolgere un ruolo importante nella forte riduzione del numero di cellule germinali mature completamente funzionanti. Questo fatto, associato alla forte riduzione del numero di tubuli seminiferi normalmente strutturati<sup>20</sup>, potrebbe ridurre, sebbene

non impedire, la possibilità di fecondazione degli uomini anziani.

Un altro interessante aspetto, è il significato dell'acido sialico nell'endotelio dei vasi durante l'invecchiamento. Infatti, l'acido sialico è costantemente assente nei vasi dei soggetti del gruppo 2A, mentre è sempre presente nei soggetti del gruppo 1A. Paniagua et al.<sup>20</sup> affermarono che il processo di involuzione tubulare che avviene con il progredire dell'età, è simile a quanto osservato in seguito ad ischemia sperimentale, suggerendo quindi che le lesioni vascolari potevano essere determinanti nel processo dell'atrofia testicolare legata all'invecchiamento di questo organo. L'ipotesi è che una mancanza di produzione di acido sialico nelle cellule endoteliali degli uomini più anziani, potrebbe contribuire all'alterazione dell'integrità della membrana plasmatica e dell'adesione intercellulare, determinando lesioni vascolari. Inoltre, in questa tesi è stato

dimostrato che, durante l'invecchiamento, avvengono cambiamenti dei sialoderivati anche nello stroma testicolare. Questo probabilmente è correlato ai cambiamenti della struttura dello stroma che intervengono nel processo dell'invecchiamento<sup>20,37</sup>. I cambiamenti dell'acido sialico, sia a livello vascolare che stromale, potrebbero contribuire a determinare l'atrofia testicolare.

Per quanto riguarda l'ovidotto, mediante le due metodiche istochimiche delle lectine, è stato dimostrato che le cellule epiteliali sono caratterizzate da una grande quantità di sialoderivati sia nelle donne fertili che in quelle in postmenopausa. Non sono state osservate differenze significative nella distribuzione dell'acido sialico tra la porzione ampollare e quella istmica in entrambi i gruppi di studio e, tra le donne fertili, nelle diverse fasi ormonali. Tali osservazioni concordano con i risultati ottenuti in alcune specie di

mammiferi come il ratto<sup>17</sup>, ma non in altre come il coniglio<sup>1</sup>. In particolare, in entrambi i gruppi di studio, è stata osservata la presenza di acido sialico legato  $\alpha$  2-3 al galattosio<sup>1,6</sup> sulla superficie luminale sia delle cellule secernenti che di quelle ciliate e sulle ciglia delle cellule ciliate. Inoltre è stata dimostrata la presenza di acido sialico legato  $\alpha$  2-6 al galattosio o galattosamina<sup>1,15</sup>, ma soltanto sulle ciglia e sulla superficie luminale delle cellule ciliate.

In tutte le donne fertili e nella maggior parte di quelle in postmenopausa, è stato possibile osservare acido sialico legato al D-galattosio-( $\beta$ 1-3)-N-acetyl-D-galattosamina sulla superficie luminale delle cellule secernenti e sulle ciglia e sulla superficie luminale delle cellule ciliate. In alcune pazienti in postmenopausa è stata riscontrata una minor quantità di acido sialico legato a questo dimero, mentre in altre non era addirittura presente. E' ipotizzabile che l'acido sialico legato al D-galattosio-( $\beta$ 1-3)-N-acetyl-D-galattosamina

sia coinvolto nel mantenimento della funzionalità delle ciglia. Secondo Schulte e Spicer<sup>3</sup> e Ino et al.<sup>41</sup>, l'acido sialico manterrebbe separate le ciglia, garantendo così il loro movimento: di conseguenza, la sua mancanza in alcune donne in postmenopausa potrebbe portare ad una diminuzione della loro motilità.

Nelle cellule epiteliali di tutte le donne fertili e di alcune in postmenopausa, è stata riscontrata la presenza di acido sialico contenente gruppi acetilici su C<sub>4</sub> dell'anello piranosidico<sup>24</sup>. In tutti i casi, sia di donne fertili che in postmenopausa, è stato osservato acido sialico contenente gruppi O-acetilici su C<sub>7</sub> e/o C<sub>8</sub> e/o C<sub>9</sub> delle catene laterali<sup>25</sup>.

In alcune donne fertili ed in postmenopausa, la lamina propria era caratterizzata dalla presenza di acido sialico legato  $\alpha$  2-3 e  $\alpha$  2-6. In tutte le donne fertili, la lamina propria ha mostrato la presenza di acido sialico legato al D-galattosio-( $\beta$ 1-3)-N-acetyl-D-galattosamina, ma solo in alcuni casi era presente

acido sialico contenente gruppi acetilici su C<sub>4</sub> e su C<sub>7</sub> e/o C<sub>8</sub> e/o C<sub>9</sub>. Nell'ovidotto delle donne in postmenopausa, l'acido sialico legato al dimero, con o senza gruppi acetilici, ha mostrato andamento discontinuo.

L'acido sialico legato  $\alpha$  2-3 e  $\alpha$  2-6 e legato al D-galattosio-( $\beta$ 1-3)-N-acetyl-D-galattosamina, è stato riscontrato, con poche eccezioni, nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni sia delle donne fertili che in postmenopausa. In alcuni casi di donne in postmenopausa era presente anche acido sialico con gruppi acetilici su C<sub>4</sub>.

Il diverso contenuto di sialoderivati sulla superficie luminale dell'epitelio, nella lamina propria e nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni dell'ovidotto di alcune donne in postmenopausa, rispetto a quelle fertili, potrebbe indicare una glicosilazione alterata del glicocalice delle cellule epiteliali, delle fibre di collagene dello stroma e della membrana plasmatica delle cellule

endoteliali. Tale alterazione potrebbe essere correlata alle alterazioni morfofunzionali che avvengono durante l'invecchiamento dell'organo.

Tutti questi dati riguardano un numero limitato di casi, sia di donne fertili che in postmenopausa. Comunque, le pazienti di entrambi i gruppi di studio rientrano in un largo range di età e per quanto riguarda il gruppo di donne fertili, sono presenti casi in entrambe le fasi ormonali del ciclo mestruale. Per questo motivo è ipotizzabile che questi dati siano rappresentativi di un maggior numero di casi.

A differenza di quanto osservato in altri mammiferi<sup>1,42</sup>, nell'ovidotto umano non sembra esserci secrezione di acido sialico, in quanto non si è osservata reattività delle lectine con i granuli di secrezione nel citoplasma delle cellule secernenti. Questo suggerisce che l'acido sialico sia assente nel fluido oviduttale e quindi non prenderebbe parte in nessuna funzione normalmente attribuita a tale fluido, come ad esempio



aumentare la capacitazione degli spermatozoi ed il loro legame alla zona pellucida, facilitare la penetrazione degli spermatozoi e l'aumento della sua viscosità, la protezione immunologica della cellula uovo, degli spermatozoi e dell'embrione in fase precoce<sup>43-46</sup>. I diversi sialoderivati, invece, sono stati costantemente ritrovati sulla superficie luminale delle cellule epiteliali dell'ovidotto, senza nessuna differenza significativa tra la porzione istmica e ampollare o durante le fasi del ciclo mestruale.

Molti studi hanno dimostrato l'importanza dell'acido sialico nell'ovidotto di diverse specie di mammiferi nel trattenere, capacitare e aumentare la motilità degli spermatozoi. Questo è dovuto alla presenza di gruppi sialilati sulla superficie apicale delle cellule epiteliali dell'ovidotto e sulla membrana della testa degli spermatozoi. Questi gruppi sono caratterizzati dalla presenza di cariche negative, cosicché gli spermatozoi possono legarsi alle cellule epiteliali dell'ovidotto grazie

all'interposizione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>1,16,17,45</sup>. In altri mammiferi, come ad esempio il cavallo ed i bovini, queste funzioni sono state attribuite ad altri oligosaccaridi<sup>47-51</sup>. Comunque, un ruolo importante soprattutto nella fase preovulatoria attribuito a questi oligosaccaridi, è quello di trattenere gli spermatozoi con un legame spermatozoi-epitelio, formando così un reservoir istmico. Sebbene non vi sia nessuna differenza nel tipo e/o nella distribuzione cellulare dell'acido sialico nell'ampolla e nell'istmo dell'ovidotto umano anche nella fase preovulatoria, non è possibile ipotizzare un ruolo sicuro dell'acido sialico nel reservoir istmico, come invece accade in altri animali. Anche Cortes et al.<sup>17</sup> osservarono nel ratto che la distribuzione di sialoglicoconiugati nell'ampolla e nell'istmo era la stessa e non variava neanche durante l'estro. Comunque, gli stessi autori avevano osservato in precedenti lavori, che il legame degli spermatozoi con l'epitelio oviduttale era limitato alla porzione

istmica e nelle fasi di proestro e di estro<sup>52</sup>. Le ipotesi degli autori a tale proposito sono state varie. E' possibile infatti che il legame degli spermatozoi sia limitato all'istmo perché è il primo segmento incontrato dai gameti maschili quando arrivano nell'ovidotto. Le sialoglicoproteine realmente coinvolte nel legame potrebbero essere troppo piccole per poter essere messe in evidenza. Inoltre, gli ormoni sessuali potrebbero influenzare la capacità delle cellule spermatiche di legarsi all'epitelio oviduttale. Una simile ipotesi potrebbe essere estesa anche all'ovidotto umano. Non è possibile comunque escludere un ruolo dei sialoderivati nella capacitazione: infatti è ben risaputo che la capacitazione degli spermatozoi è conseguente al loro attacco alla superficie luminale dell'epitelio oviduttale<sup>53-56</sup>.

Un altro ruolo svolto dagli oligosaccaridi potrebbe essere quello di aumentare la mobilità degli spermatozoi e di facilitare il transito della cellula uovo

e dell'embrione in fase precoce lungo l'ovidotto. La progressione degli spermatozoi e della cellula uovo è regolata dal movimento delle ciglia. La presenza di acido sialico con cariche negative, potrebbe svolgere un ruolo nel mantenimento della funzionalità delle ciglia, come precedentemente riportato, mantenendole separate le une dalle altre.

Infine, è interessante osservare i dati che emergono dal confronto della reattività ottenuta con le due metodiche delle lectine in entrambi gli organi osservati. Infatti, sia nell'ovidotto che nel testicolo, la reattività con SNA e MAA in molti casi è apparsa talvolta più intensa se paragonata a quella ottenuta con PNA dopo trattamenti. Questo può essere dovuto al fatto che metodi diretti e indiretti identificano acido sialico legato in modo diverso ai vari residui zuccherini<sup>1,23</sup>. Inoltre, sia nell'ovidotto che nel testicolo, in molti casi è stata osservata una maggiore intensità

di reattività alla PNA dopo trattamenti rispetto a quanto osservato con MAA ed SNA. E' noto che l'acido sialico può essere legato ad altri acidi sialici, costituendo così catene di diversa lunghezza, le quali, probabilmente, interferiscono con i legami della MAA e della SNA, che riconoscono l'acido sialico ed i suoi legami  $\alpha$  2-3 e  $\alpha$  2-6 al penultimo residuo zuccherino di galattosio e/o galattosamina. Attualmente non esistono metodi diretti per dimostrare la presenza di tali catene.

**Conclusioni** - I principali risultati di questa tesi riguardo al testicolo, hanno mostrato che una variazione significativa della distribuzione dei vari tipi di acido sialico sembra essere correlata ad importanti cambiamenti morfo-funzionali nelle varie componenti testicolari che intervengono durante l'invecchiamento dell'organo. Questo fatto potrebbe testimoniare l'importanza dei sialoderivati nella funzionalità del testicolo di uomini adulti e nella sua involuzione.

Per quanto concerne le tube uterine, un dato importante che emerge da questa tesi è la presenza di sialoderivati sulla superficie luminale delle cellule epiteliali dell'ovidotto delle donne fertili, con la medesima distribuzione nelle diverse fasi ormonali e sia nella porzione ampollare che istmica. Questo suggerisce un ruolo dell'acido sialico nella capacitazione degli spermatozoi e nella mobilità e facilitazione del transito della cellula uovo e dell'embrione in fase precoce lungo l'ovidotto. Inoltre, una distribuzione simile dei sialoderivati nell'ovidotto di alcune donne in postmenopausa, a prescindere dall'età, potrebbe indicare che alcune funzioni dell'ovidotto siano mantenute. E' ipotizzabile che alcune donne in postmenopausa indipendentemente dall'età potrebbero presentare un livello ormonale ancora sufficiente per mantenere una quasi normale distribuzione dei sialoderivati.

Sulla base di queste osservazioni, risulta evidente che il significato della variazione dei sialoderivati legato all'invecchiamento, appare molto più eclatante nel testicolo rispetto alle tube. Pertanto, mentre nel testicolo, la variazione dei tipi di acido sialico sembra segnare la progressiva involuzione di tale organo, da questo punto di vista l'ovidotto umano appare un "evergreen", almeno per quanto riguarda alcune donne.

## 5 BIBLIOGRAFIA

[1] Gabrielli MG, Bondi AM, Materazzi G, Menghi G. Differential location and structural specificities of sialic acid- $\beta$ -D-Gal sequences belonging to sialoderivatives of rabbit oviduct under hormonal treatment. *Histol Histopathol* 2004;19:1175-86.

[2] Schulte BA, Rao KP, Kreutner A, Thomopoulos GN, Spicer SS. Histochemical examination of glycoconjugates of epithelial cells in the human Fallopian tube. *Lab Invest* 1985;52:207-19.

[3] Schulte BA, Spicer SS. Histochemical methods for characterizing secretory and cell surface sialoglycoconjugates. *J Histochem Cytochem* 1985;33:427-38.

[4] Varki A. Sialic acid as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 1997;11:248-55.

[5] Shibuya N, Goldstein IJ, Brockaert W-F, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. The edeberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the



Neu5Ac( $\alpha$ 2,6)Gal/GalNAc sequence. J Biol Chem 1987;262:1596-601.

[6] Wang WC, Cummings RD. The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid linked  $\alpha$ 2,3 to penultimate galactose residues. J Biol Chem 1988;263:4576-85.

[7] Gheri G, Noci I, Gheri CF, Vichi D, Zappoli Thyron GD, Marini M, Buccoliero AM, Sgambati E. The sialoglycoconjugates in the oviducts of fertile and postmenopausal women. Maturitas. 2007;58(3):269-84.

[8] Arenas MI, Madrid JF, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R. Lectin histochemistry of the human testis. Int J Androl. 1998;21(6):332-42.

[9] Gheri G, Vannelli GB, Marini M, Zappoli Thyron GD, Gheri RG, Sgambati E. Distributional map of the terminal and sub-terminal sugar residues of the glycoconjugates in the prepubertal and postpubertal testis of a subject affected by complete androgen

insensitivity syndrome (Morris's syndrome): lectin histochemistry. *Histol Histopathol.* 2004;19(1):1-8.

[10] Lee MC, Damjanov I. Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat Rec.* 1985;212:282-87.

[11] Malmi R, Kallajoki M, Suominen J. Distribution of glycoconjugates in human testis. A histochemical study using fluorescein- and rhodamine- conjugated lectins. *Andrologia.* 1987;19:322-32.

[12] Wollina V, Schreiber G, Zollmann C, Hipler C, Gunther E. Lectin-binding sites in normal human testis. *Andrologia* 1989;21:127-130.

[13] Wu Tj, Lee S, Jih MH, Liu JT, Wan YY. Differential distribution of glycoconjugates in human reproductive tract. *Fertil Steril* 1993;59:60-4.

[14] Kiss H, Walter I, Lehner R, Egarter C, Breitenacker G, Bock P. Lectin histochemistry of fallopian tube epithelial cells. *J Reprod Med* 1998;43:535-40.

[15] Gheri G, Noci I, Sgambati E, Borri P, Taddei G, Gheri Bryk S. Ageing of the human oviduct: lectin histochemistry. *Histol Histopathol* 2001;16:21-8.

[16] Demott RP, Lefebvre R, Suarez SS. Carbohydrates mediate adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 1995;52:1395-403.

[17] Cortès PP, Orihuela PA, Zùniga LM, Velàsquez LA, Croxatto HB. Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biol Reprod* 2004;71:1262-9.

[18] Schultka R, Cech S. Application of "mild" periodic oxidation to the ultrahistochemical detection of sialic acid-compounds in human Fallopian tube epithelium. *Acta Histochem* 1990;88:65-9.

[19] Hafez ESE. Scanning electron microscopy of female reproductive organs during menopause and related pathologies. In: Fioretti P, Martini L, Melis GB, Yen SSC, editors. *The menopause: clinical endocrinological and pathophysiological aspects, serono symposium*. London and New York: Academic Press; 1982. p.201-17.

- [20] Paniagua R, Nistal M, Sàez FJ, Fraile B. Ultrastructure of the aging human testis. J Electron Microsc Tech. 1991;19(2):241-60.Review.
- [21] De Miguel MP, Bethencourt FR, Arenas MI, Fraile B, Paniagua R. Intermediate filaments in the Sertoli cells of the ageing human testis. Virchows Arch. 1997;431(2):131-8.
- [22] Holstein AF. Spermatogenesis in the aged – a borderland between normal and pathologic anatomy. Urologe A. 1986;25(3):130-7.
- [23]Madrid JF, Aparicio R, Sàez FJ, Hernández F. Lectin cytochemical characterization of the N- and O-linked oligosaccharides in the human rectum. Histochem J 2000;32:281-9.
- [24]Moschera J, Pigman W. The isolation and characterization of rat sublingual mucus-glycoprotein. Carbohydr Res 1975;40:53-67.
- [25]Roberts JP. Histochemical detection of sialic acid residues using periodate oxidations. Histochem J 1977;9:97-102.

[26]Plendl J, Schonleber B, Schmahl W, Schumacher V. Comparison of the unmasking of lectin receptors by neuraminidase and by enzyme-free buffer alone. J Histochem Cytochem 1989;37:1743-4.

[27] Martinez-Menarguez JA, Ballesta J, Aviles M, Madrid JF, Castellás MT. Influence of sulphate groups in the binding of peanut agglutinin. Histochemical demonstration with light- and electron-microscopy. Histochem J 1992;24:207-16.

[28] Gheri G, Sgambati E. Lectin binding in the choroids plexuses of the chick embryo. It J Anat Embryol. 2003;108:119-128.

[29] Gheri G, Russo G, Cappugi P, Sgambati E, Gheri Bryk S. The oligosaccharidic component of the glycoconjugates in lichen planus, granuloma annulare, seborrheic keratosis and palmoplantar keratoderma: lectin histochemical study. Histol Histopathol. 1999;14:697-704.

[30] Gheri Bryk S, Gheri G, Sgambati E, Pastore I. Changes in expression of the oligosaccharides in the human fetal skin. Ann Anat 1997;179:49-56.

[31] Gheri G, Vannelli GB, Marini M, Zappoli Thyron GD, Sgambati E. Lectin binding in the human foetal testis. *Histol Histopathol* 2003;18:735-40.

[32] Werner R, Eckart K, Christian B, Wolfgang G. (1982) Biological significance of sialic acid. In: Schauer R (ed) *Sialic Acid: Chemistry, Metabolism and Function. Cell Biology Monography* , vol 10. Springer, New York, pp 263-305.

[33] Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130.

[34] Miething A. Arrested germ cell divisions in the ageing human testis. *Andrologia* 2005;37(1):10-6.

[35] Dakouane M, Bicchieray L, Bergere M, Albert M, Vialard F, Selva J. A histomorphometric and cytogenetic study of testis from men 29-102 years old. *Fertil Steril* 2005;83(4):923-8.

[36] Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G,

Penney G, Tarlatzis B, ESHRE Capri Workshop Group. Fertility and ageing. Hum Reprod Update. 2005;11(3):261-76.

[37] Ayisi K, Schmiegelow P, Lindner J, Sames K. Connective tissue aging in the human hypophysis-gonadal system. Pathol Res Pract. 1982;173(3):294-302.

[38] Schulze W, Schulze C. Multinucleate Sertoli cells in aged human testis. Cell Tissue Res. 1981;217(2):259-66.

[39] Neaves WB, Johnson L, Petty CS. Seminiferous tubules and daily sperm production in older adult men with varied numbers of Leydig cells. Biol Reprod. 1987;36(2):301-8.

[40] Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodriguez MC, Martin A. Seminiferous tubule involution in elderly men. Biol Reprod. 1987;36(4):939-47.

[41] Ito T, Newkirk C, Strum JM, McDowell EM. Changes in glycoconjugates revealed by lectin staining in the developing airways of syrian golden hamster. Anat Rec 1990;228:151-62.

[42] Desantis S, Acone F, Corriero A, Deflorio M, Cubani D, Ventriglia G, Palmieri G, De Metrio G. Distribution of sialoglycoconjugates in the oviductal isthmus of the horse during anoestrus, oestrus and pregnancy: a lectin histochemistry study. *Eur J Histochem* 2004;48:403-12.

[43] Way AL, Schuler AM, Killian GJ. Influence of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on sperm-egg binding and fertilization in vitro. *J Reprod Fertil* 1997;109:95-101.

[44] Rodriguez C, Killian G. Identification of ampullary and isthmic oviductal fluid proteins that associate with the bovine sperm membrane. *Anim Reprod Sci* 1998;54:1-12.

[45] Leese HJ, Reischl J, Downing SJ. Formation of Fallopian tubal fluid: role of neglected epithelium. *Reproduction* 2001;121:339-46.

[46] Killian GJ. Evidence for the role of the oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2004;82:141-53.



[47] Suarez SS. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanism of formation. Biol Reprod 1998;58:1105-7.

[48] Suarez SS, Ignatz G. Fucosylated glycoproteins from oviductal epithelium bind PDC-109 and maybe involved in creating the reservoir of sperm in the bovine oviduct. In: 34<sup>th</sup> Annual Meeting Society for the Study of Reproduction. 2001.

[49] Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. Reproduction 2001;122:519-26.

[50] Suarez SS. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. Reprod Dom Anim 2002;37:140-3.

[51] Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. Hum Reprod Update 2006;12:23-37.

[52] Orihuela PA, Ortiz ME, Croxatto HB. Sperm migration into and through the oviduct following artificial insemination at different stages of estrous cycle in the rat. Biol Reprod 1999;60:908-13.

[53] Kervancioglu ME, Djahanbakhch O, Aitken RJ. Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertil Steril* 1994;61:1103-8.

[54] Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barrat CL, Cooke ID. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod* 1995;10:2603-9.

[55] Murray SC, Smith TT. Sperm interaction with Fallopian tube apical membrane enhances sperm motilità and delays capacitation. *Fertil Steril* 1997;68:351-7.

[56] Kervancioglu ME, Saridogan E, Aitken RJ, Djahanbakhch O. Importance of sperm-to-epithelial cell contact for the capacitation of human spermatozoa in Fallopian tube epithelial cell cocultures. *Fertil Steril* 2000;74:780-4.