

# Microlitiasi testicolare e proliferazione delle cellule leydig nei ratti wistar sottoposti a procedure tipo Fowler-Stephens

*Testicular microlithiasis and leydig cell proliferation in wistar rats underwent fowler-stephens procedure*

E. Gougoudi,<sup>1</sup> Z. Zachariou,<sup>2</sup> E. Kogia,<sup>1</sup> A. Zavitsanakis<sup>1</sup>

*Key words: undescended testis, microlithiasis, Leydig cell tumor, Wistar rats*

## Abstract

**Objectives:** The present study investigates the outcome of Fowler-Stephens operation in prepubertal Wistar rats focused on microlithiasis and Leydig cell hyperplasia development.

**Methods:** Thirty-eight (38) animals underwent laparoscopic Fowler-Stephens operation on the right testis (8 of them formed the control group) and 6 of them additional contra-lateral orchiectomy. The testes were examined histological 9,30,70 and 90 days later, while ultrasound study was performed a day earlier.

**Results:** Initially, atrophic signs were visible as early as 9 days after the operation. Signs of intratubular calcification were obvious 30 days after the operation, in severe atrophic testes. Another important point was that in the animals that underwent orchiectomy, testicular microlithiasis co-existed with lesions of Leydig cell hyperplasia.

**Conclusions:** Microlithiasis and Leydig cell hyperplasia seem to have causative relation in operated undescended testis and present serious postoperative complications, with a review in the literature.

## Riassunto

**Scopo:** Il presente studio indaga il risultato dell'intervento di Flower-Stephens nei ratti prepubere Wistar sullo sviluppo della microlitiasi e di iperplasia delle cellule del Leydig.

**Metodi:** Trentotto (38) animali sono stati sottoposti ad intervento laparoscopico secondo Fowler-Stephens al testicolo di destra (8 di loro erano il gruppo di controllo) e 6 di essi ad orchietomia controlaterale supplementare. I testicoli sono esaminati dal punto di vista istologico 9,30,70 e 90 giorni dopo e con ultrasonografia ad intervalli specifici di tempo.

**Risultati:** Inizialmente, i segni di atrofia erano visibili sin dal 9° giorno dopo l'intervento. Nella severa atrofia testicolare, i segni di calcificazione intratubulare risultarono evidenti 30 giorni dopo l'intervento. Un altro importante dato era che gli animali sottoposti ad intervento di orchietomia, la microlitiasi testicolare coesisteva con lesioni di iperplasia delle cellule del Leydig.

**Conclusione:** Noi abbiamo cercato di trovare qualsiasi relazione causale tra testicoli ritenuti operati e quelle complicanze postoperatorie (microlitiasi e iperplasia), con una revisione della letteratura.

## Introduzione

La microlitiasi testicolare, nota anche come calcificazione testicolare intratubulare, è un raro problema con una prevalenza dello 0.05-0.60%.<sup>4,10,17,28,31</sup> Alcuni studi riferiscono una incidenza dello 1.3-2%, percentuale che aumenta fino al 15% negli uomini sterili.<sup>5,15</sup> La sua incidenza riscontrata con l'ultrasonografia è segnalata tra lo 0.6 e il 9%.<sup>22</sup> La microlitiasi testicolare è di solito asintomatica, e non progressiva, riscontrata in maniera casuale con un'ecografia eseguita per altri motivi, associata a diverse anomalie genetiche, infertilità e tumori del testicolo.<sup>4,21,28</sup> Criptorchidismo, ipogonadismo, varicocele, torsione testicolare, danno ischemico, il carcinoma in situ, tumore a cellule germinali, pseudoermafroditismo maschile, sindrome di Klinefelter, microlitiasi alveolare polmonare, l'AIDS, la neu-

<sup>1</sup> Pediatric Surgical Department, Medical School, Aristotelian University of Thessaloniki, Greece

<sup>2</sup> University of Bern, Swiss

Indirizzo per la corrispondenza (Corresponding author):

Gougoudi Evagelia  
 Pediatric Surgeon, Medical School Lecturer, Aristotelian University  
 25 Martiou str. 4A  
 N.751 Panorama 55236 Thessaloniki - Greece  
 Tel: ++302310343000  
 FAX: ++302310341174  
 e-mail address: evagougoudi@yahoo.com

rofibromatosi di tipo I, sono le più comuni patologie benigne e maligne che ricorrono associate con la microlitiasi testicolare.<sup>1,4,8,10,14,15,25,27,28,42</sup> In particolare per i tumori delle cellule germinali (più del 90% dei tumori testicolari) l'incidenza della coesistenza è di ben il 40% negli adulti. Questo dato ha sollevato il sospetto che la microlitiasi potrebbe essere una lesione premaligna e che non possa essere considerata una lesione benigna, un reperto casuale.<sup>4,6,30,36</sup>

Nel presente studio sperimentale si è cercato di individuare l'effetto dell'intervento di Fowler-Stephens nei testicoli ritenuti per quanto riguarda lo sviluppo dell'atrofia testicolare e della microlitiasi. Abbiamo affrontato la microlitiasi testicolare come complicanza postoperatoria di tipo atrofico e abbiamo anche rilevato ogni relazione con la proliferazione delle cellule del Leydig, mentre le anomalie di tali cellule sono comuni nei ratti tipo Wistar, specialmente come conseguenza di criptorchidismo indotto sperimentalmente.<sup>29</sup> Abbiamo valutato le caratteristiche della microlitiasi testicolare e la proliferazione delle cellule del Leydig con l'ultrasonografia e mediante esame al microscopico ottico.

## Materiali e metodi

### Animali

Questo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Università di Heidelberg ed è stato condotto in conformità con la normativa Tedesca in materia di benessere degli animali da laboratorio.

Sono stati utilizzati trentotto (38) ratti tipo Wistar, di sesso maschile, e 30 giorni di età, di peso intorno ai 200 gr. In questa età prepubere gli animali hanno ancora ritenuti i loro testicoli a livello intraddominale. Essi sono stati mantenuti in coppie in gabbie a temperatura, umidità e luce (12 ore di luce/buio) in ambiente controllato, con libero accesso a cibo e acqua di rubinetto. Gli animali sono stati suddivisi in maniera random in tre gruppi: 24 ratti sottoposti alla procedura di Fowler-Stephens (gruppo FS) e 8 ratti SHAM considerati come gruppo controllo (gruppo C) una volta che la SHAM operazione serve come controllo (gruppo C) Il gruppo FS è stato a sua volta suddiviso in 4 sottogruppi di 6 animali ognuno. 9, 30, 70 e 90 giorni dopo l'intervento nello stesso tempo un gruppo e 2 animali del gruppo di controllo sono stati sottoposti ad esame ultrasonografico e valutazione istologica. Sei (6) ratti sono stati sottoposti alla stessa procedura più orchietomia contro laterale (gruppo FSO); per bloccare l'attività del testicolo contro laterale, mentre venivano effettuati gli esami ultrasonografici e istologici 90 giorno dopo l'intervento chirurgico.

### Anestesia, intervento, e procedure postoperatorie

Tutti gli esami e le procedure operatorie sono state effettuate in anestesia generale. Questo obiettivo è stato raggiunto mediante iniezione intraperitoneale di Tiopentale sodico al 2.5% diluito con cloruro di sodio allo 0.9% alla dose di 0.1ml/100gr per peso corporeo dopo che

negli animali era stata indotta anestesia di tipo inalatorio con etere. Un endoscopio di 2mm (0°, 7210 AWA, Karl Storz, Germania) è stato inserito nella cavità peritoneale nel punto di mezzo della distanza sulla linea xifo-pubica. Il pneumoperitoneo con CO<sub>2</sub> è stato creato con un catetere venoso (22G) inserito nel lato destro dell'endoscopio mentre nel suo lato sinistro abbiamo inserito una cannula "operativa" di 1,7 mm (Endoscopio Karl Storz, Germania). I vasi spermatici di destra sono stati identificati, sezionati, coagulati e divisi per mezzo di un gancio (hook), approssimativamente ad 1 cm di distanza dal testicolo evitando ogni tipo di contatto con il dotto deferente. Gli strumenti sono stati rimossi, il pneumoperitoneo eliminato, la fascia e la cute chiusi in strati. Nel gruppo FSO, il testicolo controlaterale è stato esportato attraverso una piccola incisione scrotale. Nel sham animali operati abbiamo eseguito la stessa procedura, ma invece della coagulazione, abbiamo semplicemente manipolato i vasi per circa 6 minuti, il tempo paragonabile necessario per la procedura FS. Gli animali sono poi stati rimessi nelle loro gabbie.

I testicoli di tutti gli animali sono stati esaminati con l'ultrasonografia 8, 29, 69, e 89 giorni dopo l'intervento chirurgico. Il giorno dopo, e cioè al nono, al 30esimo, al 70esimo e 90esimo giorno postoperatorio, gli animali sono stati rioperati per la fissazione della perfusione dei testicoli iniettando direttamente in aorta del polivinilpirrolidone al 2%, del cloridrato di procaina allo 0.2%, glutaraldeide all' 1.5% e paraformaldeide all' 1.5%. Dopo di che le gonadi sono state asportate ed esaminate istologicamente.

### Valutazione ultrasonografica

Questa procedura è stata effettuata sempre dallo stesso esaminatore in maniera standardizzata per minimizzare la variabilità individuale dell'osservatore. Abbiamo esaminato, con l'apparecchiatura Elegra (Siemens), i bordi e il volume di ogni testicolo così come la normalità e l'ecogenicità del parenchima testicolare. Per determinare la vascolarizzazione e l'apporto di sangue è stata inoltre impiegata l'ecografia Doppler.

Nonostante la standardizzazione degli anestetici, 2 animali del sottogruppo del nono giorno di postoperatorio insieme a 2 animali del sottogruppo del 30esimo giorno di postoperatorio, uno del sottogruppo del 70esimo di giorno postoperatorio e 3 del gruppo FSO del 90esimo giorno di postoperatorio, sono morti durante la scansione ecografica, morte dovute a reazione avversa ai farmaci.

### Istologia

La patologia è stata valutata usando sezioni in paraffina e epon e la colorazione di Richardson. Brevemente, le sezioni sono state incubate in DAB (3,3'), osmificate con OsO<sub>4</sub> all'1% e colorate con uranil-acetato all'1%. Sono state poi disidratate, trattate con il propylenoxide e l'epon; e stabilizzati in epon. La colorazione di Richardson ( miscela di Azzurro II e blu di Metilene) è stata scelta per il vantaggio della più facile identificazione delle mast cellule dovuta a metacromasia.

## Risultati

### Ultrasonografia

I testicoli degli animali del gruppo SHAM operati avevano i margini chiaramente visibili, parenchima omogeneo, normale afflusso di sangue e nessuna calcificazione. I vasi principali diretti alle gonadi sono stati identificati con un distinto segnale di flusso. Gli stessi tratti caratterizzavano i testicoli di sinistra in tutti i ratti sottoposti ad intervento di FS. Al contrario, i testicoli destra di questi animali manifestavano segni di atrofia, cioè ridotto afflusso di sangue sin dal nono giorno di postoperatorio. La porzione centrale del parenchima appariva eterogeneo con ridotto apporto di sangue, mentre le porzioni periferiche rimanevano inalterate. Nel gruppo FS, 30 giorni dopo l'intervento, sono stati rilevati meno distintamente i margini e le calcificazioni, mentre i testicoli di destra di tutti e quattro gli animali non presentavano segni di ecogenicità dovuta a calcificazioni. L'apporto di sangue era ridotto in periferia e minimizzato centralmente. Simili evidenze di atrofia sono state osservate in 3 dei 5 animali del sottogruppo del 70esimo giorno di postoperatorio (Sottogruppo 70B) e in 2 animali del sottogruppo del 90esimo giorno di postoperatorio (Sottogruppo 90B). I testicoli di destra al contrario in 2 animali del sottogruppo del 70esimo giorno di postoperatorio (Sottogruppo 70°) e in 4 animali del sottogruppo del 90esimo giorno di postoperatorio (Sottogruppo 90A e 90C) erano normali. Nel gruppo FSO, 1 dei 3 esaminati hanno mostrato omogeneità del parenchima testicolare (sottogruppo 90A'), mentre entrambe le zone centrali e periferiche erano adeguatamente vascolarizzate. Negli altri 2 ratti, le alterazioni erano simili a quelle dei sottogruppi 70B e 90B (sottogruppo 90B'). Il volume non è stato possibile determinarlo dal momento che i margini non erano ecograficamente chiari, il parenchima era eterogeneo con calcificazioni spiccate (approssimativamente 5mm) nella zona

centrale. Nessuna vascolarizzazione è stata determinata in entrambi gli animali (tabella I).

### Microscopia ottica

La struttura di entrambi i testicoli negli animali di controllo e dei testicoli di sinistra nel gruppo FS si è dimostrata normale. I tubuli seminiferi avevano un distinto, netto lume ed erano densamente distribuiti in un pattern esagonale. Numerosi tubuli erano intimamente associati alla tunica albuginea. All'interno dell'epitelio germinativo gli spermatogoni e le cellule del Sertoli formavano uno strato discontinuo adiacente alla membrana basale. Le cellule del Sertoli contenevano piccoli vacuoli lipidici circondati da cellule germinali. Lo spazio interstiziale conteneva una fitta rete di capillari, pochi macrofagi e agglomerati di piccoli gruppi di cellule del Leydig attorno i capillari. Essi erano sferici o allungati e contenenti piccoli vacuoli lipidici. Poche mast cellule erano confinate nella zona periferica del testicolo in prossimità della tunica albuginea.

Le alterazioni ischemiche viste nei testicoli di destra dopo la divisione dalle proprie arterie possono essere suddivise in una forma lieve e in una forma grave. Nel primo, i processi apoptotici erano confinati alle cellule germinali della sola regione centrale. La forma grave includeva un progressivo fenomeno apoptotico riguardante tutto: le cellule germinali, le cellule del Sertoli e le cellule del Leydig; microlitiasi massiccia nella zona centrale e la completa ostruzione del lume seminifero da parte di detriti cellulari e da calcificazioni. Di interesse, quei testicoli con le gravi alterazioni degenerative erano le stesse in cui veniva riscontrata una riduzione della vascolarizzazione all'ultrasonografia. Invece, i testicoli con parenchima omogeneo all'ultrasonografia e vascolarizzazione indenne mostravano la forma lieve di atrofia o nessun segno di atrofia. Pertanto i due tipi di atrofia probabilmente riflettono la possibilità di sopperire o meno alle richieste di sangue tramite circoli collaterali. Più in dettaglio, 9 giorni dopo la procedura, i tubuli seminiferi in

Tabella 1					
U/S ESAME E RISULTATI					
Giorno p.o.(no)	Margini	ecogenicità	calcificazione	Vascolarizzazione periferica	Vascolarizzazione centrale
<b>Gruppo di controllo (8)</b>					
8 (2)	n	n	-	n	n
29 (2)	n	n	-	n	n
69 (2)	n	n	-	n	n
89 (2)	n	n	-	n	n
<b>Gruppo e sottogruppo FS (19)</b>					
8 (4)	n		-	n	r
29 (4)	-	eterogeneo	+	r	m
69 (5)					
70A (2)	n	n	-	n	n
70B (3)	-	eterogeneo	+	r	m
89 (6)					
90A (1)	n	n	-	n	n
90B (2)	-	eterogeneo	+	r	m
90C (3)	n	n	-	n	n
<b>Gruppo e sottogruppo FSO (3)</b>					
89 (3)					
90A' (1)	n	n	-	n	n
90B' (2)	-	eterogeneo	+	r	m

tutti e quattro i testicoli di destra erano ridotti e ristretti, mentre il lume conteneva numerose cellule apoptotiche in tutti gli stadi della spermatogenesi e della formazione di spermatidi. La disorganizzazione dell'epitelio germinativo consisteva in un disarrangiamento degli spermatogoni, spermatociti e spermatidi senza stratificazione. La disintegrazione pronunciata e i processi apoptotici sono stati anche osservati nel tessuto interstiziale, compreso le cellule mioidi, le cellule del Leydig e le cellule che compongono i vasi sanguigni. Trenta (30) giorni dopo la procedura, tutti e quattro i testicoli di destra mostravano tre caratteristiche e distinte zone di parenchima: i) la zona periferica, adiacente alla tonaca albuginea, discontinua, in cui i tubuli seminiferi si dimostravano grandi, atrofici e parzialmente calcificati. I tubuli non calcificati erano più piccoli mentre il loro epitelio germinativo consisteva in spermatogoni apoptotici e poche cellule del Sertoli. Diversi strati di microblasti peritubulari, numerosi capillari sanguigni o linfatici intatti e una delicata rete di sottili cellule del Leydig allungati e cellule simil fibroblastiche attorno i tubuli seminiferi. Questa zona periferica era caratterizzata da un incremento del numero di capillari sanguigni, da un'abbondanza di mast cellule e da proliferazione focale delle cellule del Leydig. ii) la zona intermedia che aveva numerosi piccoli e atrofici, tubuli seminiferi non calcificati sparsi in un tessuto connettivo lasso e racchiuso da un singolo strato di miofibroblasti piatti. Questa zona era caratterizzata da grandi cellule simili ai macrofagi ricche in lipidi indicante i tubuli atrofici e da numerosi tipici macrofagi nello spazio interstiziale, e iii) La zona centrale con tubuli seminiferi relativamente grandi, esagonali e compattati calcificati ostruiti da detriti cellulari e ricoperti da un epitelio completamente atrofico. Non poteva essere riconosciuta nessuna cellula spermatogonica e cellule del Sertoli. Pochi capillari sanguigni; erano state anche osservati diversi rami calcificati dell'arteria testicolare e diffusa microlitiasi.

Settanta (70) giorni dopo la procedura i tre testicoli (sottogruppo 70B) con riduzione della vascolarizzazione all'ultrasonografia presentavano severa atrofia dei tubuli seminiferi, sebbene la zona di pattern non era tanto evidente. Tutti i tubuli erano evidenti ma marcatamente ristretti nelle sezioni trasversali, mentre lo spazio interstiziale era aspanso. Più della metà dei tubuli seminiferi, possedeva un epitelio germinativo marcatamente accorciato e distrutto con quasi nessuna cellula spermatogonica ed erano ricoperti esclusivamente da grandi cellule del Sertoli molto vacuolizzate. Le alterazioni di tipo degenerativo nei rimanenti tubuli erano meno pronunciate con cellule spermatogoniche identificabili in quasi tutti i tubuli; e un quasi tipico, continuo, strato basale di cellule del Sertoli con piccoli vacuoli. I due ratti con segni sonografici di vascolarizzazione intatta presentavano atrofia più lieve (sottogruppo 70A). Novanta (90) giorni dopo la procedura di Fowler-Stephens, i due animali (sottogruppo 90B) con segni sonografici di diminuita vascolarizzazione avevano i testicoli severamente atrofici e dei restanti quattro animali con normale vascolarizzazione, tre presentavano atrofia intermedia e quattro nessun segno di atrofia. I due testicoli di destra completamente atrofici mostravano di nuovo i tre distinti pattern di parenchima. I tre testicoli con atrofia intermedia (sottogruppo 90C) mostravano gruppi di 5-7 tubuli atrofici con

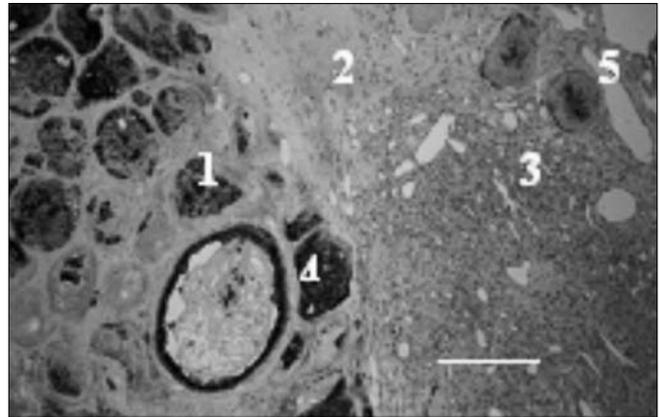


Figura 1.

Immagine istologica al microscopio ottico (90esimo giorno postoperatorio)

1. Tubuli centrali calcificati
  2. La zona intermedia
  3. La zona periferica occupata da cellule di Leydig iperplastiche
  4. Grandi vasi sanguigni nella zona centrale
  5. Tubuli calcificati intrapolati nella lesione di iperplasia (colorazione immunostochimica)
- Bar 400

diametri ridotti sparsi tra i tubuli quasi normali. L'epitelio germinativo era corto, privo della normale struttura multistrato, e spesso consisteva esclusivamente di cellule del Sertoli altamente vacuolizzate. I testicoli di destra degli ultimi animali (sottogruppo 90A) aveva una normale morfologia con tubuli seminiferi ben sviluppati, tipico epitelio germinativo e spazio interstiziale.

Nel gruppo FSO, il ratto con segni ecografici normali (sottogruppo 90A') non mostrava atrofia all'esame istologico, mentre gli altri due ratti (sottogruppo 90B') mostravano testicoli con atrofia completa dell'epitelio germinativo in maniera del tutto simile a quella descritta per il sottogruppo FS al 30esimo giorno di postoperatorio. Inoltre, nella zona periferica, sono state osservati miofibroblasti, capillari sanguigni e linfatici ed anche lesioni di proliferazione delle cellule del Leydig. Agglomerati di cellule del Leydig erano stati ritrovati esclusivamente nelle zone periferiche dei testicoli. I piccoli foci nodulari si trovavano all'interno del tessuto connettivo lasso adiacente la tunica albuginea. Essi erano allineati in una fila e alternati con tubuli atrofici in un arrangiamento simile a perle. La maggior parte delle cellule del Leydig si mostravano allungati e a forma di stella, contenenti poche, piccole gocce lipidiche. Numerose mast cellule (responsabili della forte metacromasia) erano stati osservate nel tessuto connettivo perinodulare così come nella zona intermedia del testicolo. I noduli erano forniti di una fitta rete di capillari (Fig 1).

## Conclusioni

Nonostante un trattamento adeguato, i testicoli ritenuti operati raggiungevano un volume di circa la metà rispetto al volume di un testicolo disceso fisiologicamente. Tale differenza può essere la causa di un danno al testicolo determinato dalla condizione primitiva e anche dal trauma chirurgico del trattamento operatorio. Il flusso di

sangue al testicolo si riduce come indicato dal Doppler a seguito della manipolazione e soprattutto dopo la trazione dell'arteria testicolare.<sup>21,26,34,41,44</sup> I risultati indicano che le alterazioni nei testicoli ritenuti siano riduzione del volume, alterazioni della struttura interna e di superficie, microlitiasi e mancanza di flusso rilevabile.<sup>16</sup>

Nel presente studio la divisione dei vasi spermatici ha provocato grave degenerazione testicolare in 15 dei 30 animali operati (gruppi FS e FSO). Ciò è stato dimostrato dai cambiamenti delle caratteristiche negli ultrasuoni e nell'istologia. Sebbene la microlitiasi testicolare sia di solito una diagnosi istologica, può essere indirettamente visualizzata con gli ultrasuoni, come alterata ecogenicità e dei bordi testicolari. La microlitiasi è stata riscontrata in 11 dei ratti operati.

La calcificazione intratubulare testicolare è ritenuta essere il risultato della degenerazione dell'epitelio seminifero eliminato nel lume tubulare. I detriti, precipitati nel lume, si accumulano lì sotto forma di una glicoproteina e strati di calcio ed evolve nelle caratteristiche forme istologiche. Altri ritengono che la microlitiasi derivi dalla disfunzione delle cellule del Sertoli in relazione ad un'anomala embriogenesi gonadica.<sup>2,11,24,28,31,38,40</sup>

La valutazione dell'aspetto ecografico consiste in ecogenicità inferiori a 1-3 mm, con nessuna ombra acustica. Essi si sviluppano nel parenchima testicolare con una distribuzione periferica o centrale in un aspetto che viene chiamato «tempesta di neve». Possono anche essere viste in agglomerati. Essi sono di solito bilaterali, anche se sono stati riportati anche unilaterali. Non ci sono generalmente criteri accettati su quanti foci ecogenici dovrebbero essere presenti per porre la diagnosi. Alcuni classificano la microlitiasi come classica se ne si repertano 5 o più per ogni piano sonografico e limitata se non corrisponde a questo criterio. Questo punto, non sempre valutato, ma un minor numero di microliti è associato a malignità.<sup>4,8,10,17,21,25,28,32,33,37,39</sup>

L'aspetto della valutazione ecografica della microlitiasi nel presente studio è stato individuato soprattutto nella zona centrale del parenchima testicolare come un'immagine a «tempesta di neve», mentre in alcuni casi sono stati identificati determinate aree chiaramente con ombra acustica. Le aree calcifiche, al Doppler, non hanno mostrato alcun apporto di sangue in quanto i rami dei vasi sanguigni testicolari erano anch'essi calcifici. Istologicamente le calcificazioni erano intratubulari e intravascolari, mentre l'epitelio germinativo era ridotto alla membrana basale.

La microlitiasi è correlata ad una più alta incidenza di neoplasie del testicolo tardive ed è raccomandato un follow-up ecografico a lungo termine.<sup>20,31,38,43</sup> È riferito lo sviluppo di un tumore entro un determinato periodo che va dai 6 mesi a 7 anni successivamente alla diagnosi di microlitiasi.<sup>6,13,27,30</sup> Il verificarsi di microlitiasi con neoplasia testicolare ed extra testicolare è di circa il 18-45%; tuttavia non ci sono prove di relazione di causa effetto tra queste condizioni.<sup>4,27</sup> Inoltre le calcificazioni più grandi possono essere associate a teratocarcinoma, mentre le microcalcificazioni con neoplasia delle cellule germinale testicolari. Microcalcificazioni sono state osservate più spesso in non seminomi che in seminomi.<sup>4,8,10,17,21,28,32,33,37,39,44</sup> Per quanto riguarda il carcinoma in situ (CIS), la microlitiasi è un segnale di disgenesia insieme alla povertà di spermatogenesi e tubuli

incompleti differenziati. È importante che la microlitiasi possa essere considerata il primo segno individuato con gli ultrasuoni.<sup>9,18</sup> Un altro punto interessante è la co-ricorrenza di microlitiasi testicolare e tumori extratesticolari senza tumore testicolare primitivo (nel mediastino o nell'addome).<sup>1,19</sup> Il tumore delle cellule del Leydig è il più comune tumore nei ratti Wistar, al contrario negli umani dove i tumori delle cellule del Leydig sono rari e ad andamento benigno.<sup>3</sup> Di solito si verifica nei ratti vecchi (di età superiore ai 18 mesi), è bilaterale e l'incidenza aumenta con l'età, soprattutto nei ratti alimentati ad libitum.<sup>29</sup> L'iperplasia delle cellule del Leydig o l'ipertrofia sono successivi al danno dei tubuli seminiferi. Le cause più comuni sono l'irradiazione con raggi X, il trattamento con agenti chimici, sostanze chimiche cancerogene, e carenza cronica di vitamine. Anche il criptorchidismo sperimentale è stato segnalato come una delle cause.<sup>29,7</sup> Il termine proliferazione si riferisce sia all'iperplasia che alla neoplasia. I nuclei iperplastici delle cellule del Leydig sono leggermente più grandi del normale, mentre i nuclei neoplastici sono di notevoli dimensioni. Se la lesione è inferiore a 1-3 volte il diametro medio tubulare si parla di iperplasia, se è più grande è definito come un tumore. La definizione implica che solo lesioni di dimensioni superiori a 3 volte il diametro dei tubuli seminiferi hanno un potenziale di crescita autonomo. Per quanto riguarda la forma, un gruppo normale di cellule del Leydig sono angolari, mentre le lesioni iperplastiche sono più grandi e arrotondate.<sup>35</sup> Le cellule del Leydig iperplastiche circondano i vasi sanguigni all'interno del tessuto connettivo lasso interstiziale.<sup>12</sup> Le cellule neoplastiche contengono una maggiore quantità di gocce lipidiche. Nelle lesioni neoplastiche sono state osservate cellule immature e cellule simil fibroblastiche.<sup>23</sup> Le caratteristiche che suggeriscono una neoplasia sono aumentate dimensioni cellulari, basofilia, polimorfismo nucleare, emorragia estesa e necrosi, invasione capsulare e infiltrazione all'interno dei rami vascolari e dotti linfatici.

Nel presente studio, le lesioni iperplastiche erano localizzate alla periferia dei testicoli completamente atrofici e identificati 90 giorni dopo l'intervento di Fowler-Stephens e l'orchietomia. I primi segni di iperplasia delle cellule del Leydig sono state rilevate più precocemente in maniera significativa (4° mese contro 18° mese). Le cellule proliferate contenevano un numero superiore di vacuoli lipidici, che sono diventate più grandi. Le lesioni si erano formate attorno ai vasi sanguigni.

In conclusione, l'associazione tra microlitiasi e criptorchidismo non è un evento casuale, mentre non è estremamente raro ritrovarle nei testicoli ipotrofici. La sorveglianza ecografica annuale potrebbe essere richiesta per il rischio di trasformazione maligna delle calcificazioni.

## Bibliografia

- 1 Aizenstein RI, Hibbeln JE, Sagireddy B, Wilbur AC, O'Neil HK. Klinefelter's syndrome associated with testicular microlithiasis and mediastinal germ-cell neoplasm. *J Clin Ultrasound* 1997;25:508-510
- 2 Aizenstein RI, DiDomenico D, Wilbur AC. Testicular microlithiasis: Association with male infertility. *J Clin Ultrasound* 1998;26:195-198

- 3 Assi A, Sironi M, Bacchioni AM, Declich P, Cozzi L, Pasquinelly GA. Leydig cell tumor of the testis: a cytochemical, immunohistochemical and ultrastructural case study. *Diagn Cytopathol* 1996;16:262-266
- 4 Backus ML, Mack LA, Middleton WD, King BF, Winter TC, True LD. Testicular microlithiasis: Imaging appearances and pathologic correlation. *Radiology* 1994;192:781-785
- 5 Bar-Chama NC, Zaslou SA, Braffman B, Shapiro RB, Pasik AC. Incidence of testicular cancer and microlithiasis in male infertility. *AUA Meeting* 1998
- 6 Bieger RC, Passarge E, McAdams AJ. Testicular intratubular bodies *J Clin Endocrinol Metab* 1965;25:1340-1346
- 7 Bomhard E, Vogel O, Loser E. Chronic effects on single and multiple oral and subcutaneous cadmium administrations on the testes of Wistar rats. *Cancer Lett* 1987;36(3):307-315
- 8 Bushby LH, Miller FNAC, Rosairo S, Clarke JL, Sidhu PS. Scrotal calcification: ultrasound appearances, distribution and aetiology. *Br J Radiol* 2002;75:283-288
- 9 de Gouveia Brazao CA, Pierik FH, Oosterhuis JW, Dohle GR, Looijenga LH, Weber RF. Bilateral testicular microlithiasis predicts the presence of the precursor of testicular germ cell tumors in subfertile men. *J Urol* 2004;171(1):158-160
- 10 Doherty FJ, Mullins TL, Sant GR, Drinkwater MA, Ucci AA. Testicular microlithiasis. A unique sonographic appearance. *J Ultrasound Med* 1987;6:389-392
- 11 Drut R, Drut RM. Testicular microlithiasis: histological and immunohistochemical findings in 11 pediatric cases. *Pediatr Dev Pathol* 2002;5:544-550
- 12 Ertlin RA, Qureshi SR, Perentes E, Christen H, Gschwind R, Buser MW, et al. Morphological, immunohistochemical, stereological and nuclear shape characteristics of proliferative Leydig cell alterations in rats. *Path Res Pract* 1992;188:642-648
- 13 Frush DP, Kliewer MA, Madden JF. Testicular microlithiasis and subsequent development of metastatic germ cell tumor. *AJR Am J Roentgenol* 1996;167:889-890
- 14 Furness PD, Husmann DA, Brock JW. Multi-institutional study of testicular microlithiasis in childhood: a benign or premalignant condition? *J Urol* 1998;160:1151-1154
- 15 Ganem JP, Workmann KR, Shaban SF. Testicular microlithiasis is associated with testicular pathology. *Urology* 1999;53:209-213
- 16 Harrison JD, Tweedie J, Wilson C, Rance C, Kapila L. Measurement of testicular blood flow at orchidopexy with a solid state laser. *Surgery* 1991;109:160-162
- 17 Hobarth K, Susani M, Szabo N, Kratzik C. Incidence of testicular microlithiasis. *Uroradiology* 1992;40:464-467
- 18 Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. *Ann Oncol* 2005;16:863-868
- 19 Howard RG, Roebuck DJ, Metreweli C. The association of mediastinal germ cell tumour and testicular microlithiasis. *Pediatr Radiol* 1998;28:998
- 20 Husman DA. Cryptorchidism and its relationship to testicular neoplasia and microlithiasis. *Urology* 2005;66(2):424-426
- 21 Jansen DL, Mathieson JR, Marsh JI, Cooperberg PL, Del Rio P, Golding RH, et al. Testicular microlithiasis: sonographic and clinical features. *AJR* 1992;158:1057-1060
- 22 Ikinger U, Wurster K, Terwey B, Mohring K. Microcalcifications in testicular malignancy: diagnostic tool in occult tumor? *Urology* 1982;19:525-528
- 23 Kerr JB, Donachie K. Regeneration of Leydig cells in unilaterally cryptorchid rats: evidence for stimulation by local testicular factors. *Cell Tissue Res* 1986;245:649-655
- 24 Kessar DN, Mellinger BC. Incidence and implication of testicular microlithiasis detected by scrotal Duplex sonography in a selected group of infertile men. *J Urol* 1994;152:1560-1561
- 25 Khan MA, Beyzade B, Poduri BS. Testicular seminoma in a man with bilateral microlithiasis and a history of cryptorchidism. *Scan J Urol Nephrol* 2000;34:377-379
- 26 King LR. Optimal treatment of children with undescended testes. *J Urol* 1984;131:734-735
- 27 Kocaoglu M, Bozlar U, Bulakbasi N, Saglam M, Ucoz T, Somuncu I. Testicular microlithiasis in pediatric age group: ultrasonography findings and literature review. *Diagn Interv Radiol* 2005;11:60-65
- 28 Kutlu R, Sigirci A, Baysal T, Alkan A, Sarac K. Effects of testicular microlithiasis on Doppler parameters: report of three cases. *BMC Urology* 2002;2:3
- 29 McCluggage WG, Shanks JH, Arthur K, Banerjee SS. Cellular proliferation and nuclear ploidy assessments augment established prognostic factors in predicting malignancy in testicular Leydig cell tumours. *Histopathology* 1998;33:361-368
- 30 McEniff N, Doherty F, Katz J, Schragar CA, Klauber G. Yolk sac tumor of the testis discovered on a routine annual sonogram in a boy with testicular microlithiasis. *AJR Am J Roentgenol* 1995;164:971-972
- 31 Nistal M, Paniagua R, Diez-Pardo JA. Testicular microlithiasis in two children with bilateral cryptorchidism. *J Urol* 1979;121:535-537
- 32 Parra BL, Venable DD, Gonzalez E, Eastham JA. Testicular microlithiasis as a predictor of intratubular germ cell neoplasia. *Urology* 1996;48:797-799
- 33 Priebe CJ, Garret R. Testicular calcifications in a 4-year-old boy. *Pediatrics* 1970;46:785-788
- 34 Puri P, Sparnon A. Relationship of primary site of testis to final testicular size in cryptorchid patients. *Br J Urol* 1990;66:208-210
- 35 Qureshi SR, Perentes E, Ertlin RA, Kolopp M, Prentice DE, Frankfurter A. Morphologic and immunohistochemical characterization of Leydig cell tumor variants in Wistar rats. *Toxicol Pathol* 1991;19:280-286
- 36 Rashid HH, Cos LR, Weinberg E, Messing EM. Testicular microlithiasis: a review and its association with testicular cancer. *Urol Oncol* 2004;22:285-289
- 37 Rey D, Sibert L, Rozet F, Dunet F, Staeman F, Gresse P. Testicular microlithiasis and cancer of the testis. *Prog Urol* 2002;12(3):500-503
- 38 Riebel T, Herrman C, Wit J, Sellin S. Ultrasonographic late results after surgically treated cryptorchidism. *Pediatr Radiol* 2000;30:151-155
- 39 Schrey A, Reiter WJ, Kratzik C. Value of ultrasound in microlithiasis of the testis in andrological patients. *Ultraschall Med* 2001;22(3):143-145
- 40 Smith WS, Brammer HM, Henry M, Frazier H. Testicular microlithiasis: sonographic features and pathologic correlation. *AJR* 1991;157:1003-1004
- 41 Taskinen S, Lehtinen A, Hovatta O, Wikstrom S. Ultrasonography and colour Doppler flow in the testes of adult patients after treatment of cryptorchidism. *Br J Urol* 1996;78:248-251
- 42 Thomas K, Wood SJ, Thompson AJ. Incidence and significance of testicular microlithiasis in a subfertile population. *Br J Radiol* 2000;73:494-497
- 43 Vrachliotis TG, Neal DE. Unilateral testicular microlithiasis. *JCU* 1997;25:505-507
- 44 Yavetz H, Harash B, Paz G, et al. Cryptorchidism: incidence and sperm quality in infertile men. *Andrologia* 1992;24:293-297