

## SUI TESTICOLI SOPRANNUMERARI NEI GALLETTI DI LINEE LEGGERE SUPERNUMERARY TESTES IN CHICKENS

Banco B., Ferrari N., Cocchi L., Formenti N., Grieco V., Gallazzi D., Calligarich C., Grilli G.

*Dipartimento Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10 – 20133 Milano*

### Summary

Supernumerary testes (ST) in domestic fowl were investigated. Ninety-three groups belonging to eight genetic breeds, with a total number of 443,953 cockerels, were controlled at the moment of caponizing. The results show that frequencies of ST varied between 0.1 to 1.6% with a significant effect of the genetic lines. The causes of triorchidism are discussed.

### INTRODUZIONE

Le segnalazioni di testicoli soprannumerari nel pollame domestico sono molto scarse in letteratura (Katiyar *et al.*, 1986; Hocking, 1992; Onu, 2012), principalmente per il fatto che i galletti, sia giovani che adulti, non sono sottoposti in numero rilevante a controlli autoptici di routine a livello genitale. D'altra parte il controllo dell'apparato genitale maschile interessa solo i gruppi da riproduzione. In Italia è però diffusa la castrazione chirurgica del galletto di poche settimane di vita per la produzione del cappone natalizio, e negli ultimi anni durante questo intervento la visualizzazione delle gonadi maschili ha portato alcuni operatori a notare con una certa frequenza la presenza di testicoli soprannumerari, osservazione in contrasto con gli scarsi dati bibliografici disponibili.

Negli studi che trattano questo argomento, compresi quelli riferiti ad altre specie aviarie (McFarland, 1965; Witt e Bautista, 2011) sono riportati sia casi con coinvolgimento del testicolo destro (Katiyar *et al.*, 1986), sia di quello sinistro (Hocking, 1992). I testicoli accessori vengono descritti, quanto a struttura e consistenza, come normali pur essendo di dimensioni inferiori, e viene inoltre riferita una fertilità inalterata per alcuni dei soggetti interessati (Hocking, 1992). Va però sottolineato che secondo Nickel *et al.* (1973) negli uccelli il testicolo di sinistra è di regola più grande di quello di destra, ed entrambi sono collocati in corrispondenza del polo craniale del rene. In età prepubere il testicolo di destra è lievemente più craniale rispetto al sinistro (Gallazzi, osservazione personale).

Mentre nei broilers il problema dei testicoli soprannumerari non sussiste, in quanto macellati in età prepubere, nei maschi utilizzati per la produzione del cappone (in genere soggetti di linee genetiche selezionate per la produzione di uova) la presenza di testicoli soprannumerari non sempre visibili dall'operatore comporta l'incompleta neutralizzazione sessuale, influenzando quindi i dati della produzione e delle caratteristiche organolettiche della carne. Infatti la persistenza di testicoli soprannumerari vicarianti le funzioni di quelli asportati chirurgicamente comporta l'estrinsecazione dei caratteri sessuali secondari tipici del maschio, annullando in parte o in tutto l'effetto della castrazione.

Tale problema (incompleta neutralizzazione sessuale) non è di poco conto in Italia in quanto la produzione del tradizionale cappone natalizio è molto consistente. Non sono stati riscontrati dati ufficiali nei resoconti statistici delle produzioni avicole nazionali, ma, da una nostra indagine presso le principali aziende avicole italiane, risulta che annualmente la produzione del cappone raggiunge qualche milione di unità.

## MATERIALI E METODI

Al fine di controllare la presenza dei testicoli soprannumerari (TS) nei galletti di linee leggere da uova, in Italia tipicamente impiegati per la produzione del cappone natalizio, sono state controllate otto linee genetiche differenti (qui indicate con sigle di fantasia) e precisamente: 50 gruppi della linea genetica A per un totale di 228.928 maschi, 23 gruppi di linea genetica B per un totale di 155.886 soggetti, 6 gruppi di linea genetica C con 31.106 soggetti capponati, 4 gruppi di linea genetica D per un totale di 10.154, 7 gruppi di linea genetica E per un totale di 15.884 soggetti e infine tre piccoli gruppi costituiti da 272 soggetti di linea genetica F, 145 di linea genetica G e 1578 di linea genetica H. Dei 443.953 soggetti totali, 296.878 sono stati capponati nell'estate 2014, mentre 147.075 nell'estate 2015. I soggetti sono stati capponati a un'età compresa tra i 18 e i 30 giorni da due operatori esperti che agivano in coppia e annotavano la presenza di testicoli soprannumerari rilevati durante la procedura. La differente età dell'intervento dipendeva dalla linea genetica.

L'individuazione di TS negli stessi gruppi è risultata sovrapponibile tra i due operatori, ma va precisato che il numero totale risulta probabilmente sottostimato per l'oggettiva difficoltà di individuare i TS, stante talvolta le loro piccolissime dimensioni, specie per quelli controlaterali rispetto al lato dell'incisione, normalmente effettuata a destra .

I dati registrati sono stati analizzati statisticamente attraverso il programma R 3.3.1 tramite un modello generalizzato lineare, con distribuzione binomiale, in modo da verificare l'effetto della linea genetica sulla percentuale di testicoli soprannumerari. Il limite di significatività considerato è  $P < 0,05$ .

Di ogni linea genetica sono stati prelevati alcuni campioni di TS da sottoporre ad esame istologico al fine di definire la struttura microscopica del tessuto. Questi ultimi comprendevano 40 TS prelevati al momento della capponatura e perciò ancora immaturi e un TS prelevato da un soggetto adulto nel quale era stata osservata la presenza di un TS al momento della capponatura, che era stato lasciato in sede fino al raggiungimento dell'età adulta e alla macellazione (PA 79/14). Inoltre la nostra casistica includeva 8 campioni prelevati da soggetti impuberi privi di TS e 2 da galli adulti (campioni prelevati al macello), fungenti da controllo negativo. Tutti i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. I TS e quelli di animali impuberi normali, date le loro ridotte dimensioni (circa 8-10x2-3 mm i testicoli normali e circa 1x2-3 mm i soprannumerari, Fig. 1), sono stati fissati in formalina tal quali, per intero. I testicoli normali di gallo, più voluminosi, sono stati inizialmente sezionati in due metà. Tutti i campioni sono rimasti in formalina tamponata al 10%, per almeno 3 giorni, per garantire una fissazione ottimale. Successivamente si sono ottenute sezioni multiple di 0,3-0,4 mm di spessore dei testicoli maturi, mentre i testicoli so-

prannumerari ed i testicoli immaturi/impuberi, date le loro ridotte dimensioni, sono stati processati interi. I campioni sono stati inclusi in paraffina, dopo processazione in scala crescente di alcoli e chiarificazione in xilene. Da ciascun blocchetto così ottenuto sono state infine prodotte sezioni seriate di 5 micron di spessore. Una di tali sezioni è stata colorata con Ematossilina-Eosina ed è stata destinata all'esame istologico.

## RISULTATI

Come risulta dalla Tab. I la presenza di TS è notevolmente differente a seconda della linea genetica considerata.

LINEE GENETICHE	N. GRUPPI	N. SOGGETTI	TS	%
A	50	228.928	516	0,23
B	23	155.886	1972	1,27
C	6	31.106	251	0,81
D	4	10.154	10	0,10
E	7	15.884	71	0,45
F	1	272	2	0,74
G	1	145	1	0,69
H	1	1.578	25	1,58

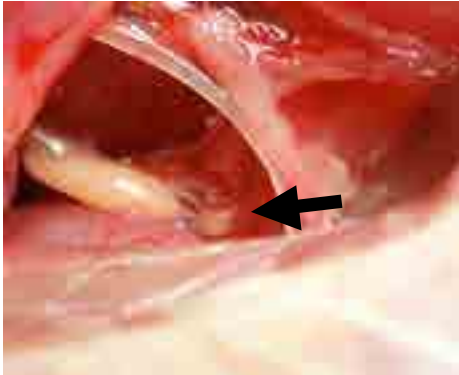
**Tabella 1.** Composizione e frequenza di testicoli soprannumerari nelle linee genetiche.

L'analisi statistica ha evidenziato un effetto significativo ( $dev=168$ ,  $g.l.=7,9$ ,  $p<0,001$ ) della linea genetica sulla percentuale di TS. In particolare, tra le linee genetiche con la più alta incidenza di TS vi sono la linea B (1,27%) e la linea C (0,81%). La linea genetica risultata più sensibile al problema, per quanto il numero di animali su cui sono disponibili i dati sia molto inferiore rispetto alle due linee precedenti, era rappresentata dalla linea H, le cui percentuali riportate raggiungono l'1,58%.

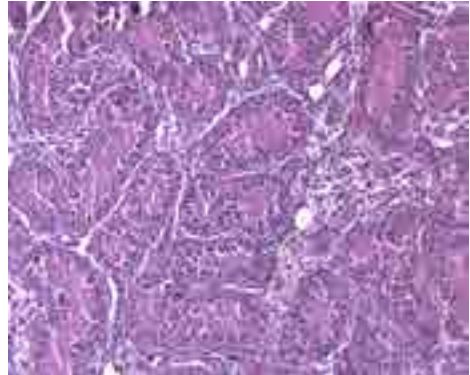
All'analisi istologica i testicoli soprannumerari ed i testicoli immaturi/impuberi mostravano caratteristiche sovrapponibili (Fig. 2 e 3). Nei campioni esaminati era possibile riconoscere sia la tunica albuginea esterna che il parenchima testicolare ed i tubuli dell'epididimo. Il parenchima testicolare era costituito da numerosi tubuli seminiferi, circondati da una variabile quantità di stroma interstiziale, all'interno del quale era possibile identificare un limitato numero di cellule di Leydig, di forma poligonale, e numerosi vasi sanguigni. I tubuli seminiferi apparivano rivestiti da cellule del Sertoli, di aspetto triangolare, poggianti sulla spessa membrana basale tubulare. Frammiste a queste ultime, si osservava la presenza di un limitato numero di cellule rotonde, identificate come spermatogoni. Il lume dell'epididimo era vuoto. In nessun caso vi era alcuna differenza morfologica tra il testicolo normale e il testicolo soprannumerario, che differiva soltanto per le dimensioni assai ridotte.

I testicoli normali di gallo erano invece caratterizzati da ampi tubuli seminiferi con un lume ben definito, circondati da scarso stroma interstiziale, e un limitato numero di cellule di Leydig. All'interno dei tubuli seminiferi si osservava la linea seminale completa, nella quale erano identificabili spermatogoni, spermatociti, spermatidi e numerosi spermatozoi. Questi ultimi erano abbondantemente presenti, inoltre, all'interno del lume dei tubuli dell'epididimo (Fig. 4).

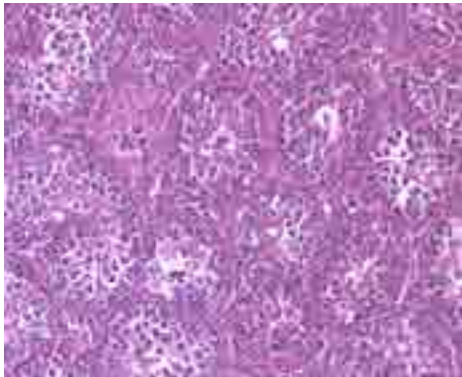
Per quanto riguarda il campione PA 79/14 (Fig. 5), che faceva riferimento al soggetto adulto nel quale era stata riscontrata la presenza di un testicolo soprannumerario al momento della macellazione, le gonadi primarie ed il piccolo testicolo soprannumerario mostravano le medesime caratteristiche istologiche e lo stesso grado di maturazione della linea seminale.



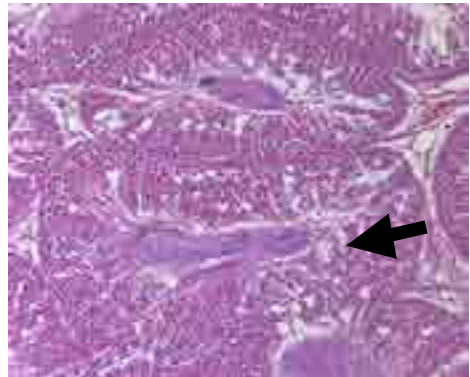
**Fig. 1.** Apertura cavità celomatica, lato dx: al polo craniale del testicolo principale si osserva la presenza di un piccolo testicolo soprannumerario (freccia).



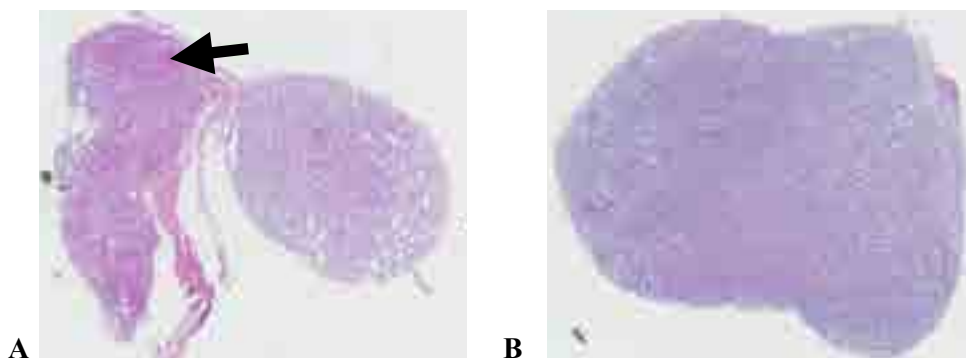
**Fig. 2.** Testicolo soprannumerario, soggetto di 30 gg: i tubuli seminiferi sono ben conformati, hanno lume assai ridotto e linea germinale incompleta. Si osservano numerose cellule del Sertoli, lungo la membrana basale, e un limitato numero di spermatozoi. Ematossilina Eosina, 200x



**Fig. 3** Testicolo impubere (immaturo), soggetto di 30 gg: i tubuli seminiferi sono ben conformati, hanno lume assai ridotto e linea germinale incompleta. I tubuli sono rivestiti da uno strato di cellule del Sertoli, appoggiate alla lamina basale, e da uno scarso numero di spermatozoi. Ematossilina Eosina, 200x.



**Fig. 4.** Testicolo maturo di gallo: tubuli seminiferi con linea seminale completa. All'interno del lume tubulare si osservano numerosi spermatozoi (freccia). Lo stroma interstiziale è assai ridotto. Ematossilina Eosina, 100x



**Fig. 5.** PA 79/14, gallo adulto. Scansione. Testicolo soprannumerario (A) e testicolo normale (B). A carico di entrambi i tessuti si osserva la presenza di numerose strutture tubulari (tubuli seminiferi) che costituiscono il parenchima di entrambi i testicoli. Nel testicolo soprannumerario si osserva, inoltre, la presenza di un'ampia porzione di epididimo (freccia). Ematossilina Eosina.

## DISCUSSIONE

Pur essendo difficile stabilire con certezza quale percentuale dei mancati capponi a fine ciclo di allevamento sia imputabile a errore chirurgico per incompleta ablazione delle gonadi e quale a presenza di testicoli soprannumerari, l'attenzione degli operatori durante la fase di capponatura ha permesso di consolidare l'ipotesi che la presenza di tali testicoli sia stata sottostimata per anni e possa essere in realtà un fattore che incide sulla casistica riportata. Anche questo nostro stesso lavoro non può essere considerato preciso in modo assoluto per quanto concerne il numero dei TS rilevati, per la difficoltà di rilevare i TS controlaterali rispetto al lato dell'incisione chirurgica, per le dimensioni dei TS talvolta ridotte al limite della visibilità e per la soggettività legata all'operatore. Comunque, proprio questi dati hanno portato gli operatori del settore a sospettare che il problema dei testicoli soprannumerari fosse più esteso di quanto si pensasse in passato. Per quanto venga spesso riferito dai macellatori che anche in caso di evidente estrinsecazione di caratteri sessuali secondari (quali ad esempio la cresta rossa) in molti casi l'aspetto e le caratteristiche organolettiche della carne rimangono quelle del cappone, è chiaro che il problema può raggiungere un'entità non trascurabile per le aziende produttrici.

Il presente studio ha permesso inoltre di ipotizzare una componente genetica che influenzi una diffusione del problema molto superiore in determinate linee genetiche rispetto ad altre.

L'esame istologico ha permesso di confermare i precedenti studi sull'argomento, nei quali veniva affermata la persistenza di un aspetto microscopico del parenchima del tutto sovrapponibile a quello dei testicoli normali e la persistenza di funzionalità spermatogonica dei TS, come confermato dal campione PA 79/14 (Fig. 5), nonostante le differenze macroscopiche in quanto a dimensioni e consistenza (Katiyar *et al.*, 1986; Shrivastava *et al.*, 1988; Onu JE, 2012). Anche in campo umano è stato dimostrato che in più della metà dei soggetti con triorchidismo l'attività spermatogonica è conservata (Spranger *et al.*, 2002; Savas *et al.*, 2009).

L'eziologia di questo fenomeno non è ancora chiara, anche se già nel 1992 era stata suggerita da Hocking la possibilità che fosse associato ad un difetto congenito piuttosto diffuso nel pollame domestico e negli uccelli in generale (McFarland 1965; Katiyar *et al.*, 1986; Shrivastava *et al.*, 1988; Graves, 2004; Witt e Bautista, 2011; Onu, 2012). Tuttavia saranno necessari ulteriori studi per approfondire l'argomento.

## CONCLUSIONI

La nostra indagine ha permesso di trarre alcune conclusioni sulla presenza dei TS nei galletti di linea leggera, che possono essere sinteticamente così riportate:

1. Esiste una significativa differenza tra le diverse linee genetiche ( $P < 0,05$ ). Infatti in alcuni ceppi genetici il fenomeno è fino a 15 volte più frequente: le percentuali variano da 0,10 a 1,58% (Tab. I).
2. Bisogna tener conto di una inevitabile sottostima del dato dovuta alla difficoltà di individuare i TS più piccoli nelle condizioni di campo in cui si è operato.
3. Morfologicamente i testicoli soprannumerari si presentano più piccoli ma istologicamente identici a quelli normali, come riferito dagli altri autori che hanno studiato l'argomento (Hocking, 1992; Onu, 2012).
4. L'eziologia del fenomeno è ancora da chiarire. Secondo la maggior parte degli autori il triorchidismo sembra essere legato ad un difetto congenito, come anche riportato in medicina umana (Hocking, 1992; Spranger *et al.*, 2002; Savas *et al.*, 2009). Nei casi da noi rilevati non è stato possibile stabilire se si trattasse di triorchidismo di tipo A, cioè con connessione del TS al dotto deferente, o di tipo B, senza questa connessione. Nelle specie aviarie domestiche e selvatiche il triorchidismo è riportato sporadicamente, mentre nella casistica da noi considerata sembra che la pressante selezione genetica cui alcuni ceppi sono sottoposti abbia giocato un ruolo predisponente al fenomeno.

*Ringraziamenti: gli autori sono grati alla signora Antonia Albonetti per la fattiva partecipazione nella raccolta dei dati di campo.*

## BIBLIOGRAFIA

- Graves GR. Testicular volume and asymmetry are age-dependent in Black-throated Blue Warblers (*Dendroica caerulescens*). *Auk*. 2004. 121:473–485.
- Hocking PM. Bilateral testicular asymmetry and supernumerary testis in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *British Poultry Science*. 1992. 33: 455-460.
- Jones TC, Hunt RD. *Veterinary Pathology*. 5<sup>a</sup> edizione, Lea e Febiger Eds, Philadelphia. 1983. p. 1562.
- Katiyar AK, Shrivastava AB, Awadhiya RP, Vegad JL. Supernumerary testis in a domestic fowl. *Veterinary Record*. 1986. 118: 306-307.

- McFarland LZ. A triorchid Japanese Quail. *Poultry Science*. 1965. 44:306–307.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Trattato di anatomia degli animali domestici. 1<sup>^</sup> edizione, Casa editrice Ambrosiana, Milano. 1984. Vol V: pp.76-77.
- Onu JE. Type B triorchidism in an adult indigenous fowl (*Gallus gallus domesticus*) in Sokoto, Nigeria. Case report. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. 2012. 10(1):32-35.
- Witt CC, Bautista E. Triorchidism in a hummingbird. *The Wilson Journal of Ornithology*. 2011. 123(3):632-635.
- Savas M, Yeni E, Ciftci H, Cece H, Topal U, Utangac MM. Polyorchidism: a three-case report and review of the literature. *Andrologia*. 2009. 42:57–61.
- Shrivastava AB, Katiyar AK, Awadhiya RP, and Vegad JL. Triorchidism in a domestic-fowl. *Veterinary Record*. 1988. 123:110.
- Spranger R, Gunst M, Kuhn M. Polyorchidism: a strange anomaly with unsuspected properties. *Journal of Urology*. 2002. 168(1):198.